

VERONICA LAZĂR

MICROBIOLOGIE MEDICALĂ



CUPRINS

Introducere. Obiectul de studiu al Microbiologiei medicale	7
Scurt istoric	7
Situatia epidemiologica in lume si la noi tara	14
Microbiota organismului uman	18
Microorganisme autohtone ai alohtone	18
- Factorii favorizanti ai colonizarii cu microorganisme caracteristice microbiotei normale	19
- Microbiota normala a tegumentelor	20
- Microbiota normala a tubului digestiv	21
o Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale	26
o Mecanismele rezistentei la colonizare.....	28
o Microorganisme probiotice	30
o Rolul negativ al microbiotei gastrointestinale	31
1. Microorganismele microbiotei normale – germeni oportunisti.....	31
2. Translocatia bacteriilor din intestin.....	32
3. Relatia cauza – efect intre microbiota normala – cancer.....	32
- Microbiota normala a tractului respirator	35
- Microbiota normala a tractului genito-urinar	36
Relatiile dintre microorganisme si organismul-gazda	36
- Comensalismul	36
- Simbioza	36
- Oportunismul	37
- Parazitismul	39
Microorganisme patogene si proprietatile lor definitorii	40
1. Patogenitatea	40
2. Virulenta	41
- Factori de virulenta	42
- Infectiozitatea	42
- Agresivitatea	42
o Factori de difuziune.....	43
o Agresine care interfereaza cu factori celulari si umorali bactericizi nespecifici	43

○ Enzime care favorizeaza invazia.....	43
○ Factori care interfera cu raspunsul imun.....	44
○ Rolul cationilor Fe ³⁺ in virulenta.....	45
- Capacitatea de aderenta a bacteriilor la substrat	47
○ Etapele procesului de aderenta bacteriana	47
○ Adezinele bacteriene ca factor de virulenta si implicatiile imunologice ale caracterului lor antigenic	50
Principalele tipuri de adezine si rolul lor in virulenta.....	51
Fimbriile.....	51
Capsula.....	57
Glicocalixul. Placa dentara - modul de formare si consecinte.....	58
Flagelii.....	64
„Curli”.....	65
Stratul proteic S	66
○ Receptorii de adezine. Integrine.....	68
○ Semnificatia medicala a biofilmelor bacteriene.....	72
- Toxinogeneza	75
○ Exotoxine.....	76
○ Endotoxine si lipopolizaharide (LPS).....	84
Conditile de aparitie ale procesului infectios si clasificarea infectiilor	87
Conditile de aparitie ale procesului infectios.....	87
1. Izvorul de infectie generator de agenti infectiosi.....	87
2. Calea de eliminare.....	87
3. Calea de transmitere.....	88
4. Poarta de intrare.....	88
Infectia – definitie si clasificare	89
Etapele unei infectii	92
Tipuri de evolutie epidemiologica a unei infectii	93
Principalele grupe de microorganisme patogene – caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate	95
Bacterii cu perete celular rigid	
Coci Gram pozitivi	96
<i>Fam. Micrococcaceae</i> - <i>G. Staphylococcus</i>	96
<i>Fam. Streptococcaceae</i> - <i>G. Streptococcus</i>	103
Bacili Gram pozitivi sporogeni.....	113
<i>G. Bacillus</i> – <i>B. anthracis</i>	113
- <i>B. cereus</i>	114
Bacili Gram pozitivi nesporogeni nefilamentosi	
<i>G. Corynebacterium</i>	116
<i>Listeria monocytogenes</i>	120
Bacili Gram pozitivi filamentosi	122
<i>Actinomycetes (Actinobacteria)</i>	122

Coci Gram negativi	128
<i>G. Neisseria</i> - <i>N. meningitidis</i>	128
- <i>N. gonorrhoeae</i>	128
Bacili Gram negativi facultativ anaerobi drepti.....	131
Fam. <i>Enterobacteriaceae</i>	131
<i>G. Haemophilus</i>	152
<i>G. Bordetella</i>	154
<i>G. Legionella</i>	157
<i>G. Brucella</i>	160
Bacili Gram negativi facultativ anaerobi incurbati.....	162
<i>G. Vibrio</i>	162
<i>G. Campylobacter</i> si <i>G. Helicobacter</i>	166
Bacili Gram negativi aerobi.....	169
<i>G. Pseudomonas</i>	169
Bacterii anaerobe (Gram pozitive si Gram negative, bacili si coci).....	172
<i>G. Clostridium</i>	172
<i>G. Bacteroides</i>	180
Bacili acidoalcoolorezistenti.....	182
Fam. <i>Mycobacteriaceae</i>	182
Bacterii parazite obligat intracelular.....	188
Fam. <i>Rickettsiaceae</i>	188
Fam. <i>Bartonellaceae</i>	191
Fam. <i>Chlamydiaceae</i>	192
Bacterii cu perete celular flexibil.....	197
<i>Treponema pallidum</i>	197
Bacterii fara perete celular.....	200
<i>G. Mycoplasma</i>	200
Substante antibiotice. Fenomenul de rezistenta si multirezistenta la antibiotice	205
Notiuni generale de Micopatologie.....	215
A. Levuri patogene – caractere generale si diagnosticul de laborator	217
<i>Candida albicans</i>	218
<i>Candida krusei</i>	221
<i>Cryptococcus neoformans</i>	221

Aderenta levurilor la substante inerte. Semnificatie medicala.....	222
Diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de levuri.....	224
Alte specii de levuri patogene.....	226
B. Fungi filamentosi patogeni – caractere generale si diagnosticul de laborator.....	229
Cls. <i>Phycomycetes</i>	229
Cls. <i>Ascomycetes</i>	230
- Micotoxicoze.....	233
Principii de diagnostic microbiologic	235
Metode de diagnostic.....	237
I. Diagnosticul microbiologic – etape.....	237
Prelevarea si transportul probelor patologice	238
- Conditii particulare de recoltare si transport ale principalelor produse biologice recoltate in cazul bolilor infectioase.....	239
Examenul direct (macro- si microscopic) al produselor patologice si culturilor obtinute prin insamantare pe diferite medii.....	238
- determinarea tipului morfologic si a caracterului Gram	241
Examinarea caracterelor biochimice (biotipizare).....	242
Interpretarea rezultatelor si identificarea agentului infectios -	
- Sisteme de identificare	242
- chei dichotomice	
- tabele de identificare	
- identificare asistata de calculator	
-Tipuri de teste biochimice utilizate in identificarea microorganismelor.....	244
- teste individuale (de referinta)	
- medii multitest	
- sisteme microtest	
Metode rapide de identificare/ detectare a bacteriilor.....	244
Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice a tulpinilor bacteriene izolate, prin tehnica antibiogrammei.....	247
Serotipizarea agentului patogen	247
Tipizarea fagica (lizotipie).....	249
II. Diagnosticul imunologic (serologic)	249
III. Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.....	251
Bibliografie.....	253
ANEXE I – VIII - Chei dichotomice si tabele de identificare a microorganismelor.....	267
ANEXA IX - Medii de cultura de uz microbiologic (retete).....	275

Introducere. Obiectul de studiu al Microbiologiei medicale

Microbiologia medicală este o ramură a microbiologiei generale care se ocupă cu studiul microorganismelor patogene, adică a celor dotate cu capacitatea de a iniția un proces infecțios când sunt îndeplinite condițiile necesare, cum ar fi:

- un număr corespunzător de germeni sau așa-numita doză infectantă;
- o poartă adecvată de intrare în organism;
- o anumită predispoziție a organismului gazdă.

Microorganismele (bacterii, microfungi, protozoare) sunt ubicuitare; din numărul mare de microorganisme existente în natură, un număr limitat sunt capabile să se dezvolte în asociație cu organismele superioare și dintre acestea un număr și mai redus (aprox. 550 specii) sunt patogene.

Scurt istoric. Bolile infecțioase au suscitât un interes deosebit din cele mai vechi timpuri, datorită gravității lor și modului de propagare, care determină un mare număr de victime în comunitățile umane sau printre animale.

Hipocrat (400 î.Ch.), întemeietorul medicinei, lua în considerare în generarea acestor boli participarea a doi factori: unul intrinsec, reprezentat de constituția bolnavului și altul extrinsec, constând dintr-o alterare de natură necunoscută a aerului, care devine prin el însuși nociv. Această primă ipoteză asupra etiologiei bolilor infecțioase a persistat mult timp sub forma *teoriei miasmelor* (gr. *miasma* = emanație putridă, murdărie). Într-o variantă mai concretă ea a fost formulată de Varon (100 î.Ch.), care considera că alterarea aerului (de unde și termenul *malaria* = aer rău) se datora unor animale foarte mici, invizibile, care pătrund în organism prin gură și prin nări.

Prima încercare de înlăturare a acestei concepții, devenită nesatisfăcătoare, se datorează lui Francastor (1488 - 1553), care a intuit una din caracteristicile esențiale ale bolilor produse de microorganisme și anume contagiozitatea lor. Autorul menționat considera că boala este produsă de particule mici și imperceptibile, numite semințe ale bolii (lat. *seminaria morbi*), care trec de la

un individ bolnav la altul sănătos. Fiind pur ipotetică, această concepție nu s-a putut impune până în epoca pasteuriană, când a fost dovedită experimental.

Louis Pasteur (1822 - 1895), în domeniul patologiei umane și animale, a susținut și ulterior s-a și dovedit, că orice boală infecțioasă este rezultatul activității vitale a unui anumit microorganism specific, care se dezvoltă ca parazit în organismul animal respectiv.

Cercetarile lui Pasteur consacrate viermilor de mătase (1865-1870) au dus la identificarea agenților patogeni a două boli contagioase, pebrina și flașeria, la stabilirea modului de transmitere și a particularităților de evoluție, în diferitele stadii ale metamorfozei gazdei, ca și la stabilirea unor mijloace eficiente de prevenire. Cercetările sale au rezolvat problemele grave ale sericiculturii franceze, dar au reliefat totodată și importanța cercetății experimentale a microorganismelor.

Descoperirea bacteridiei cărbunoase în sângele animalelor moarte de cărbune (Rayer și Davaine, 1850) nu a eliminat disputele dintre susținătorii și adversarii *teoriei germenilor*, care considerau fie că *Bacillus anthracis* este consecința și nu cauza bolii, fie că nu este un organism viu, ci fibrile de fibrină. Disputa a fost clarificată de R. Koch (1843-1910) care a demonstrat că bacteridia cărbunoasă este agentul patogen al bolii, pe care l-a cultivat *in vitro* în ser sanguin, studiind formarea de spori termorezistenți, alternanța dintre sporulare și germinare și caracterul specific al acțiunii sale patogene, deosebit de al altor bacterii, precum și faptul că infecția naturală a animalelor este rezultatul ingerării de iarbă contaminată cu germeni proveniți din sol. Rezultatele acestor studii asupra antraxului au fost publicate de către Koch în 1876, într-o lucrare în care se demonstrează că o bacterie este agentul cauzal al bolii, ceea ce a constituit o validare a *teoriei germenilor*.

Pasteur a confirmat rezultatele lui Koch asupra cărbunelui, izolând și cultivând agentul patogen de la animalele bolnave și din solurile în care fuseseră îngropate cadavrele acestora (susținând rolul râmelor în vehicularea sporilor și răspândirea bolii). Atras tot mai mult de patologia umană, Pasteur a demonstrat rolul bacililor anaerobi în etiologia gangrenei gazoase, al cocilor în furuncule, abcese, osteomielită și în febra puerperală, aducând alte dovezi în sprijinul *teoriei germenilor* care explica apariția bolilor infecțioase. Ulterior și-a concentrat atenția asupra modului cum, în anumite condiții, agenții infecțioși își modifică proprietățile de patogenitate și virulență, păstrându-și antigenitatea, punând astfel *bazele științifice ale vaccinării*. În 1885, Pasteur i-a injectat copilului Joseph Meister (la insistențele mamei acestuia), mușcat de un câine turbat, o suspensie obținută din țesut nervos de iepure infectat (țesut cerebral uscat, triturat și

resuspendat) cu scopul obținerii protecției antirabice. Pasteur a folosit termenul de «virus» cu sensul de otravă, deoarece nu avea nici o idee asupra naturii agentului cauzal. Deși tratamentul a avut succes, experimentul însuși este considerat astăzi ca o abatere de la standardele eticii cercetării științifice, produsele terapeutice de uz uman fiind supuse unui control foarte strict.

Compatrioții l-au onorat pe marele savant francez, construind prin subscripție publică la care au participat și străini, institutul care îi poartă numele - *Institutul Pasteur Paris* - inaugurat în 1888 și căruia savantul i s-a dedicat până în ultimele sale zile.

Alte descoperiri importante ale lui Koch și ale discipolilor săi, care au marcat evoluția microbiologiei medicale:

- 1879 - Albert Neisser a izolat agentul patogen al gonoreei (gonococul) - *Neisseria gonorrhoeae*;
- 1883 - în cadrul unei expediții întreprinse în Egipt și India, R. Koch a descoperit agentul cauzal al holerei - *Vibrio cholerae*; a obținut pentru prima dată creșterea în colonii pe felii de cartof și mai apoi pe medii solidificate cu gelatină, împreună cu elevul său Petri;
- 1883 - R. Koch a izolat și identificat bacilul care îi poartă numele (bacilul Koch), agentul patogen al tuberculozei umane - *Mycobacterium tuberculosis*; în 1884 publica lucrarea "Etiologia tuberculozei";
- 1885 - F. Escherich a izolat colibacilul (*Escherichia coli*), component al microbiotei intestinale normale, la om și animale;
- 1898 - K. Shiga a izolat agentul patogen al dizenteriei bacilare - *Shigella dysenteriae*.

Pe baza cercetărilor sale, Koch a stabilit criteriile indispensabile pentru ca un microorganism izolat dintr-un organism afectat de o anumită boală infecțioasă, să poată fi considerat ca agent cauzal al bolii respective. Aceste criterii cunoscute sub numele de *postulatele lui Koch*, reprezentând o dezvoltare și o transpunere în termeni concreți a noțiunii pasturiene de *specificitate* a activității patogene microbiene, sunt următoarele:

- 1) microorganismul incriminat trebuie să poată fi întotdeauna pus în evidență în toate cazurile bolii respective, iar distribuția lui să corespundă leziunilor caracteristice bolii;
- 2) din leziunile caracteristice, trebuie să poată fi izolat în cultură pură pe medii artificiale;
- 3) după ce este cultivat *in vitro* mai multe generații, trebuie să reproducă boala și leziunile specifice la animalele sensibile inoculate, de la care să poată fi reizolat.

Totuși Koch nu a putut reproduce holera la animale, observând el însuși o abatere de la

postulate. Ideile sale au întâmpinat rezistență; astfel un distins fizician din München (Max von Petternkofer) a ridiculizat noua teorie și pentru a-i infirma valabilitatea a băut o cultură pură de *Vibrio cholerae*, suferind de o boală diareică acută.

Ramase valabile până astăzi, chiar dacă nu *ad literam*, aceste postulate au reprezentat și reprezintă încă un principiu de lucru, a cărui respectare previne interpretările eronate în materie de diagnostic bacteriologic sau de identificare a unor noi agenți patogeni.

Koch a adus în dezvoltarea microbiologiei ca știință contribuții valoroase de ordin tehnic și teoretic, cum ar fi: conceptul de cultură pură derivată dintr-o colonie izolată (primele culturi pure au fost obținute prin diluții succesive, de medicul scoțian Lister, cel care a aplicat pentru prima dată și măsuri de antisepsie), introducerea în practica microbiologică a mediilor de cultură lichide și solide, ceea ce a constituit un progres care a stat la baza microbiologiei moderne, deoarece a permis studiul culturilor pure de microorganisme în vederea evidențierii particularităților lor de specie, a biologiei lor, a identificării și încadrării lor taxonomice. R. Koch a fost profesor la Universitatea din Berlin și distins cu premiul Nobel pentru medicină în 1905.

În 1890, Behring și Kitasato au anunțat descoperirea serului antitoxina difterică. Au injectat doze subletale de filtrat de cultură de bacil difteric la animale, obținând un ser capabil de a neutraliza toxina. Au injectat apoi un animal neinfectat cu serul respectiv, pentru a preveni o infecție ulterioară. Pentru această realizare, Behring a primit premiul Nobel în 1901.

În 1912, Paul Ehrlich (a fost cercetător în laboratorul lui Koch, unde a lucrat mai ales în domeniul imunologiei) a anunțat descoperirea unui medicament pentru tratarea sifilisului, considerat primul agent chemoterapeutic utilizat în tratarea unei boli bacteriene. A folosit un compus al arsenicului. Descoperirea sa a fost comunicată la Londra, unde s-au făcut primele tratamente împotriva sifilisului, înainte de descoperirea penicilinei (Fleming fiind unul dintre puținii medici care îl administrau).

În 1929, Alexander Fleming a publicat prima lucrare asupra *penicilinei* (descoperită în 1928) și a efectului său inhibitor asupra bacteriilor Gram pozitive. Această descoperire este considerată unică, deoarece este un exemplu rar de liză bacteriană și nu doar de antagonism interspecific, efect exercitat asupra bacteriilor de către specia de mușgai *Penicilium notatum*. Puterea antibacteriană și producerea penicilinei în cantități importante (producția la scară industrială a început în 1943) a determinat disponibilitatea și utilizarea sa în terapia antiinfecțioasă, deschizând «era antibioticelor». Pentru această descoperire, Fleming împreună cu Florey și Chain care au lucrat la purificarea și aducerea penicilinei într-o formă stabilă,

cristalizată, au primit în 1945 premiul Nobel pentru Medicină și Fiziologie.

În 1935, Gerhard J. Domagk (premiul Nobel în 1939) a utilizat pentru prima dată un antimetabolit de sinteză, numit *Prontosil*, pentru a omorî streptococii la șoareci. S-a demonstrat mai târziu ca Prontosilul este hidrolizat *in vivo* la un component activ - *sulfanilamida*.

În 1944, A. Schatz, E. Bugie și S. Waksman au descoperit *streptomycină* (premiul Nobel în 1952), antibiotic care va fi folosit în tratamentul TBC (boală infecțioasă determinată de bacteria acidoalcoorezistentă *Mycobacterium tuberculosis*). În plus, streptomycină a avut același efect antibacterian specific asupra bacteriilor Gram negative, ca și penicilina asupra celor Gram pozitive.

În 1979 variola este declarată în mod oficial eradicată (ultimul caz de infecție naturală a fost semnalat în 1977 în Somalia). La eradicarea acestei boli grave a contribuit în mare măsură campania de vaccinare lansată și finanțată de O.M.S., dar și anumite particularități ale agentului patogen - virusul variolic (*Small Pox*), respectiv marea sa stabilitate genetică și antigenică, inexistența stării de purtător.

În 1982, Prusiner Stanley a dovedit existența unei clase de agenți infecțioși subvirali - *prionii*, agenți cauzali ai unor boli degenerative ale sistemului nervos central la animale și om, descoperire pentru care i s-a decernat premiul Nobel pentru Medicină (1997).

În 1983, Luc Montagnier și Robert Gallo anunță descoperirea virusului imunodeficienței umane HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agentul cauzal al sindromului de imunodeficiență dobândită (fr. SIDA / engl. AIDS)

În 1986, Kary Mullis utilizează o enzimă termostabilă de la *Thermus aquaticus* în tehnologia de amplificare genică numită PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Enzima termostabilă ADN-polimeraza realizează replicarea secvențelor de ADN de interes, în prezența unor *primeri* oligonucleotidici complementari, reacția repetându-se în mai multe cicluri de replicare, care amplifică ADN-ul țintă. Pentru aceasta invenție de importanță majoră nu doar pentru microbiologie, ci pentru medicină în general, autorului i s-a decernat în 1993 premiul Nobel pentru Chimie.

În 1995, Craig Venter, Hamilton Smith și Claire Fraser au elucidat secvența completă a primului genom bacterian la *Haemophilus influenzae*.

De-a lungul anilor, s-au observat mai multe excepții de la postulatele lui Koch, astfel că acestea au fost reformulate de A. S. Evans în 1976. Excepțiile se referă la următoarele aspecte: anumite bacterii (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae*) nu pot fi cultivate în laborator;

pentru anumite virusuri nu existau inițial gazde sensibile (HBV, VEB); pentru unele infecții perioada de incubație este foarte lungă (boli prionice); există situații în care un microorganism patogen nu acționează singur, ci necesită cofactori genetici sau imunologici ai gazdei sau boli în care anumite forme de cancer sunt asociate cu anumite infecții virale; există boli plurifactoriale (sindrom de oboseală postviroză, posibil de etiologie microbiană); anumite boli pot fi infecțioase, dar au o incidență mică în populație, la indivizi predispuși genetic (artrita reumatismală, diabetul juvenil). Aceste observații au condus la conturarea în ultimii ani a unei **versiuni moleculare a postulatelor lui Koch**, atenția cercetătorilor deplasându-se de la identificarea bacteriilor care determină o anumită boală, spre caracterele genetice care conferă bacteriilor potențialul lor patogen. Nu există încă un acord unanim asupra criteriilor care ar fi necesare și suficiente pentru a dovedi că o anumită genă sau produsul său joacă un rol important în procesul infecțios, totuși anumite criterii au început să se impună:

- ❑ o anumită genă (sau produsul său) să fie prezentă la tulpinile patogene, nu și la cele avirulente;
- ❑ dacă gena este prezentă la bacterii care nu sunt cunoscute a determina boala, gena ar putea să fi suferit o mutație, devenind mai puțin activă sau inactivă (neexprimată) la tulpinile avirulente;
- ❑ îndepărtând o genă de virulență dintr-o tulpină virulentă, aceasta să aibă un grad de virulență mai redus și alternativa, introducând gena clonată într-o tulpină avirulentă, aceasta să devină virulentă;
- ❑ este necesar să se demonstreze că gena este exprimată de către bacterii care se află într-un animal de laborator sau voluntar uman, la un anumit moment al procesului infecțios;
- ❑ produsul genei să determine în organismul gazdă producerea de efectori imunitari protectori - umorali și celulari (respectiv anticorpi și limfocite T citotoxice).

La noi în țară, fondatorii Școlii Românești de Microbiologie au fost doi savanți formați în laboratoarele Institutului Pasteur din Paris, respectiv Victor Babeș (1854 - 1926) și Ioan Cantacuzino (1863 - 1934).

Victor Babeș s-a format în laboratorul lui Pasteur, la Paris și ulterior în laboratorul lui Koch, la Berlin. Este fondatorul microbiologiei românești, al catedrei de Microbiologie din Facultatea de Medicină din București, membru corespondent al Academiei de Medicină din Paris. Având o formație de medic anatomopatolog și abordând domeniul microbiologiei, și-a orientat cercetările spre studiul relației agenților patogeni cu organismul gazdă, mai precis asupra modificărilor produse în țesuturile gazdei ca urmare a procesului infecțios. A studiat turbarea și vaccinarea antirabică, lepra, numeroase parazitoze. A descoperit incluziile Babeș – Negri în celulele nervoase ale indivizilor morți de turbare (incluzii citoplasmice eozinofile – apărute

ca rezultat al replicării virusului rabic și formării de noi particule virale), corpusculii Babeș – Ernst în bacilii difterici (incluzii deformante de volutină, situate la capetele bacililor care capătă aspect de halteră – caracter patognomonic). Este inițiatorul seroterapiei antidifterice (terapie cu ser imun provenit de la animale vaccinate) la noi în țară. A descoperit noi specii microbiene patogene, între care și *Babesia sp.*, agent etiologic zoonotic al babeziozei, la animale și om. A colaborat cu Victor Cornil la primul tratat de bacteriologie din lume, publicat în 1890. A fost fondatorul Institutului de Bacteriologie din București, care a fost în ordine cronologică al III-lea institut de bacteriologie din lume (azi Institutul «Dr. V. Babeș»).

Ioan Cantacuzino s-a format în laboratorul lui Metchnikoff la Institutul Pasteur din Paris. A pus bazele Școlii Românești de Microbiologie, la început în Laboratorul de Medicină Experimentală al Facultății de Medicină din București fondat în 1902, apoi în Institutul de Seruri și Vaccinuri, care îi poartă astăzi numele și care face parte din rețeaua Institutelor Pasteur din lume. A studiat patogenia tuberculozei, a holerei, a preparat vaccinul antitifoparatic, antivariolic a cărui administrare în populație începând din 1913 a contribuit la limitarea cazurilor de variolă în țara noastră, vaccinul anticărbunos, antituberculos B.C.G. (țara noastră fiind a doua din lume în care s-a folosit acest vaccin). A contribuit la elaborarea primei legi sanitare din țara noastră.

Opera acestor savanți și profesori a fost continuată de urmașii lor, care s-au ridicat la înălțimea măștrilor, cum ar fi: C. Levaditi, S. S. Nicolau, N. Constantinescu (de numele acestor savanți se leagă perioada de început a dezvoltării noțiunilor clasice de virologie – tropismul virusurilor, morfopatologia virozelor, cultivarea virusurilor în laborator, fiind cei care au pus bazele școlii românești de Virusologie), M. Ciucă, D. Combiescu, C. Ionescu-Mihăești, Alexandru Slatineanu, Petre Condrea și alții. Activitatea de cercetare și aplicativă în domeniu se desfășoară în prezent în institutele de profil: Institutul de Microbiologie - Imunologie «Dr. I. Cantacuzino» din București, în Filiala acestui institut din Iași (organizată inițial de Prof. Petre Condrea), ca și în Institutul de Virusologie «Ștefan S. Nicolau».

Din Școala Cantacuzinistă provine și Prof. dr. doc. G. Zarnea, membru al Academiei Române, care a cercetat biologia rickettsiilor și a participat în anii '50 ai secolului trecut la o campanie în teren în zonele endemice de tifos exantematic din Nordul Moldovei, contribuind la eradicarea acestei boli în țara noastră. Ca profesor și fondator al Catedrei de Microbiologie Generală din Facultatea de Biologie – Universitatea din București, a contribuit la formarea a numeroase generații de microbiologi. Este autorul lucrării de referință «Tratat de Microbiologie Generală», în cinci volume, apărut la Editura Academiei Române, între anii 1983 - 1994.

Profesor dr. N. Cajal, membru al Academiei Române, a contribuit la dezvoltarea Institutului de Virusologie, la formarea multor specialiști în domeniu și la redactarea Tratatului de Virusologie Medicală, apărut la Editura Medicală (1990).

Situația epidemiologică actuală în lume și la noi în țară

Secolul XIX a fost dominat de boli infecțioase responsabile de o rată majoră de morbiditate și mortalitate: **virale** – variola; **bacteriene** – tuberculoza, difteria, holera, lepra, febra tifoidă.

Secolul XX a fost dominat de boli: **virale** - rujeola, poliomielita, SIDA, **bacteriene** – boli diareice, respiratorii, tuberculoza, tetanos; dar și **parazitare** (malaria, amibiaza, schistosomiaza, filarioza, helmintioze).

Bacteriologia medicală se prezenta la jumătatea secolului XX ca o disciplină supraviețuitoare, căreia antibioticele (descoperite de Fleming în 1928 și a căror producție la scară industrială începuse în 1943) trebuiau să-i pună capăt; azi se poate constata, dimpotrivă, vitalitatea acestei discipline. Antibioticele s-au diversificat, au câștigat mai multă putere și specificitate, sunt utilizate în multe infecții, dar sunt inactive sau inefficiente, atunci când sunt incorect alese sau confruntate cu mecanisme de rezistență noi, selecționate chiar prin antibioterapie. În prezent, bacterii "istorice" reapar determinând așa-numitele infecții *reemergente* (de ex., tuberculoza), iar mediul natural sau spitalicesc furnizează noi patologii care găsesc teren de predilecție la subiecții cu imunodeficiențe dobândite sau provocate, la care se manifestă infecții *emergente* (necunoscute anterior, determinate de bacterii cu virulență redusă) și respectiv *nosocomiale*, acestea din urmă fiind cauza unor boli de lungă durată și a spitalizării prelungite. O serie de maladii suspectate a fi de origine infecțioasă sunt în curs de cercetare:

- ☐ Maladia Kawasaki;
- ☐ Maladia Crohn;
- ☐ Sarcoidoza;
- ☐ Osteomielita multifocală recidivantă a copilului;
- ☐ Scleroza în placi;
- ☐ Diabetul insulinodependent;
- ☐ Sindromul de oboseală cronică;
- ☐ Maladia Alzheimer;
- ☐ Sindromul Guillain – Barré;
- ☐ Rectocolita hemoragică.

De exemplu, pe lângă numeroase boli neurologice care au o etiologie infecțioasă

evidentă (encefalite, meningite), anumite tulburări neurologice s-au dovedit a fi determinate de astfel de agenți infecțioși. Este cazul unor boli care inițial au fost suspectate de a avea o etiologie infecțioasă, dar agentul patogen a fost descoperit mult mai târziu (așa cum este cazul bolii Whipple, datorată infecției cu bacteria *Tropheryma whippelii*) sau în același timp (para-pareza spastică tropicală, secundară infecției cu virusul *HTLV -1*), ca și al unor boli pentru care o etiologie infecțioasă nu a fost suspectată la data descrierii anatomoclinice, ci a fost demonstrată mai târziu datorită unei fiziopatologii complexe (de ex., sindromul Guillain – Barré, consecutiv infecției cu *Campylobacter jejuni*). Există și boli neurologice idiopatice, care pot fi corelate cu microorganisme binecunoscute sau încă necunoscute, în asociere cu anumiți factori de mediu și cu o sensibilitate genetică sau dobândită a gazdei.

În prezent, cei mai mari “ucigași” de natură infecțioasă sunt:

- **Boala diareică acută:** reprezintă o problemă de mari proporții; se estimează că în lume se produc anual 1 miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane de cazuri sunt fatale, ceea ce plasează bolile diareice pe locul doi în privința cauzei mortalității prin boli infecțioase; cele mai multe cazuri mortale se înregistrează la copilul mic și în țările în curs de dezvoltare (raport O.M.S., citat de Janda și colab., 1998). În ciuda acestor cifre alarmante, agenții etiologici ai gastroenteritelor infecțioase rămân adesea nedetecțiți, investigații epidemiologice recente raportând o rată de detectare a bacteriilor enteropatogene în materiile fecale care variază între 29,1% și 52,8%. Printre agenții enteropatogeni descriși în ultimii ani figurează agenți “reputați”, cum ar fi de exemplu tulpini de *E. coli* enteropatogene (EPEC), dar și agenți mai recent descriși: tulpini de *E. coli* enteroadherente (EAEC), tulpini de *E. coli* care aderă difuz (DAEC) la celule cultivate *in vitro*, ca și unele bacterii considerate anterior ca simpli comensali ai tractului intestinal, printre care și o specie aparținând aceleiași familii a enterobacteriilor – *Providencia alcalifaciens*.
- **Bolile respiratorii acute** care fac ~ 4,4 milioane de victime / an;
- **Tuberculoza:** O.M.S. consideră că situația globală este scandalosă – 1,7 miliarde de oameni infectați, din care mor ~3 milioane de indivizi /an, 98% dintre decese fiind înregistrate în țările în curs de dezvoltare;
- **Boli cu transmitere sexuală:** 10 milioane persoane infectate/an și 3 milioane morți/an;
- **boala SIDA** face anual ~ 1 milion victime, datorită infecțiilor oportuniste cu bacterii, microfungi, paraziți și tumorilor maligne consecutive infecției virale;

- Alte boli virale: hepatita virală cu virusul HBV face anual ~ 1 milion victime;
- rujeola face anual ~ 1 milion victime;
- Boli parazitare - malarie – se înregistrează 100 milioane de cazuri noi/an și ~ 2 milioane decese /an.

În legătură cu incidența bolilor infecțioase, în prezent a apărut conceptul de *iceberg*, în care vârful blocului este reprezentat de bolile infecțioase clasice, zona mediană de boli mai puțin severe, iar partea submersă, nevăzută, de infecțiile asimptomatice prezente la indivizi care sunt purtători de agenți patogeni, pe care îi diseminează în colectivități, explicând seroconversia populației, chiar în lipsa unor infecții aparente.

Situația epidemiologică în România

Rapoarte recente ale Ministerului Sănătății permit următoarele observații:

- Se remarcă o incidentă mare a bolilor infecțioase, cum ar fi: infecții intestinale și toxiinfecții alimentare (T.I.A.), boli respiratorii (bacteriene și virale), boli parazitare, boli cu transmitere sexuală (de exemplu, în prezent se apreciază că există în România 1 milion de femei infectate cu *Chlamydia sp.*)
- Se observă o incidență mare a *infecțiilor emergente* - boli a căror incidență a crescut în ultimii 20 de ani (de ex., boli cu transmitere sexuală) și *reemergente* - boli a căror incidență scăzuse, dar este din nou în creștere, de ex. TBC - în prezent, cea mai mare endemie tuberculoasă din Europa este în România: 162 cazuri /100.000 locuitori (comparativ cu 200 cazuri în total în Suedia, dintre emigranți);
- Pentru a avea o imagine mai clară a incidenței bolilor infecțioase la noi în țară, sunt prezentate câteva date operative, extrase dintr-un buletin informativ al Min. Sănătății (« Centrul de Calcul, Statistică sanitară și Documentare medicală »/1999), care prezintă situația comparativ în anii 1998 – 1999:
 - în 1998 s-a înregistrat un număr mare de cazuri de toxiinfecții alimentare - 3142 cazuri, dizenterie bacilară - 3918 cazuri, rujeola - 9547 cazuri, rubeola - 23.529 cazuri, varicela - 50.691 cazuri;
 - în 1999 s-a înregistrat un număr mare de cazuri de boli diareice acute - 81.029 cazuri, infecții streptococice (angină streptococică - 15.023 cazuri, scarlatină - 3095 cazuri, erizipel - 2400 cazuri), hepatită virală tip A - 22.386 cazuri, parotidită epidemică - 51.385 cazuri, meningită cerebrospinală - 396 cazuri, leptospiroze - 755 cazuri.
- **cauzele morbidității prin boli infecțioase:** situația demografică, educația sanitară deficitară a populației, care influențează comportamentul alimentar, social, sexual;
- industrializarea și creșterea gradului de poluare a mediului;
- călătoriile internaționale, comerțul;

- slăbirea controlului respectării normelor de igienă la începutul anilor '90;
- adaptarea micoorganismelor la mijloacele terapeutice antimicrobiene și selecția mutantelor rezistente; creșterea virulenței agenților patogeni.

Cu privire la fenomenul de antibiorezistență și rezistență multiplă la antibiotice, la o analiză realizată de către Ministerul Sănătății, s-au făcut următoarele observații, care explică, în parte, amplificarea fenomenului:

- Antibioticele sunt folosite abuziv - se estimează că aprox. 60% din cantitatea de antibiotice recomandate sunt nenecesare, ceea ce contribuie pe de o parte la apariția antibiorezistenței, dar și a reacțiilor secundare adverse și a bolilor iatrogene; în plus, fenomenul de automedicație (antibiotice luate fără recomandarea medicului) este foarte răspândit în țara noastră, deoarece pot fi cumpărate fără rețetă medicală;
- Se fac o serie de greșeli medicale, cum ar fi:
 - se recomandă antibiotice pentru orice stare febrilă, înainte de stabilirea diagnosticului clinic;
 - interpretarea greșită a datelor de laborator sau administrarea de antibiotice înainte de a avea rezultatele antibiogramelor;
 - administrare de antibiotice în lipsa inciziei și a prelevării de produs patologic (de ex. puroi - în chirurgie), urmată de izolarea agentului cauzal al infecției și determinarea sensibilității acestuia prin tehnica antibiogramelor.

Măsurile generale de prevenire a bolilor infecțioase: monitorizarea calității mediului (necesită o infrastructură corespunzătoare); prevenție prin vaccinarea și educația sanitară a populației (în ultimii ani, s-a introdus în programa școlară a învățământului preuniversitar disciplina *Educația pentru sănătate*); cercetare biomedicală aplicativă.

Microorganismele patogene sunt perfect adaptate pentru a coloniza și a se dezvolta în nișa ecologică reprezentată de gazda lor (uneori specifică) și de a supraviețui mai mult sau mai puțin în mediul extern în perioadele de existență în afara gazdelor (în apă, aer, sol/praf, alimente, vectori). Patogenitatea constituie rezultatul adaptării microorganismelor patogene pentru o anumită gazdă de-a lungul evoluției, prin acumularea de modificări succesive prin mutații, transfer de gene și selecție. În structura genetică a patogenilor există gene cromozomale, plasmidiale sau fagice care le fac capabile să infecteze anumite celule sau gazde și să competiționeze cu mecanismele specifice și nespecifice ale imunității acestora, care în mod normal creează un mediu nefavorabil agenților patogeni. Caracterul de patogenitate al

microorganismelor este considerat în mod incorect ca fiind derivat din parazitismul lor, deși aceste proprietăți nu sunt întotdeauna asociate. Dar într-adevar, majoritatea bacteriilor patogene sunt parazite și facultativ saprotrofe, fiind capabile să se dezvolte *in vitro* pe medii organice.

Există și microorganisme strict saprotrofe, cum ar fi bacteria *Clostridium botulinum*, care nu se poate dezvolta în organism, dar care poate fi patogenă în mod indirect, printr-un produs metabolic, respectiv toxina botulinică (cea mai puternică toxină de origine biologică cunoscută).

În anumite condiții, dar mai ales la gazde compromise din punct de vedere imunologic, chiar și unele microorganisme care fac parte din microbiota normală, pot determina ocazional boala, manifestându-se ca microorganisme condiționat-patogene sau oportuniste.

Microorganismele patogene au două proprietăți caracteristice: *patogenitatea* și *virulența*. Chiar dacă există tendința actuală ca aceste noțiuni să fie utilizate ca sinonime, semnificațiile lor sunt totuși diferite: astfel, un microorganism este considerat patogen dacă are potențial capacitatea de a produce o boală, dar nu o determină decât dacă este suficient de virulent pentru a pătrunde, a coloniza organismul gazdă și pentru a contracara reacțiile de apărare ale acesteia.

“Bacteriile patogene au un întreg arsenal de arme, care le permit să invadeze un organism-gazdă și să producă boala. Problema este de a identifica armele din acest arsenal, importanța lor relativă, natura lor chimică și modul de acțiune asupra gazdei” – H. Smith; scopul urmărit este evident: prevenirea și tratamentul corect al bolilor infecțioase.

Dar înainte de a trata despre particularitățile bacteriilor patogene (v. pag. 40) care pot infecta și coloniza un organism-gazdă, trebuie caracterizate mai întâi microorganismele care colonizează tegumentele și mucoasele organismului, fără a perturba starea de sănătate a acestuia. Numărul lor la omul adult este apreciat la 10^{14} celule, din care majoritatea este localizată în tubul digestiv. Contactul microorganismelor cu organismul uman (și animal) începe chiar din momentul nașterii, un mare număr de contaminanți, mai ales tegumentari, fiind dobândiți din tractul genital matern. Deși organismele animale sunt sterile în cursul vieții intrauterine, sunt colonizate în timpul nașterii și imediat după aceasta.

Microbiota organismului uman

Microorganismele asociate cu organismul uman (animal în general) aparțin la două categorii:

- 1. Microbiota normală sau autohtonă**, asociată sau permanentă - este reprezentată de microorganismele indigene sau autohtone, respectiv din specii a căror asociere cu o anumită

specie animală a fost stabilită în cursul evoluției comune. Ca urmare, acestea sunt întâlnite datorită caracterului lor ubicuitar la majoritatea membrilor care fac parte din comunitatea respectivă. Totalitatea microorganismelor care populează tegumentele și cavitățile naturale ale unui organism sănătos alcătuiesc microbiota normală. Este reprezentată de bacterii, microfungi și protozoare. Au fost propuse următoarele criterii pentru diferențierea microorganismelor autohtone, de cele străine:

- prezența constantă la organisme convenționale, normale;
- colonizarea habitatelor specifice, succesiv, la animalele tinere;
- colonizarea anumitor regiuni particulare ale organismului;
- menținerea la nivele stabile de densitate în comunitățile stabile, echilibrate, la animalele adulte.

2. Microorganisme străine sau alohtone, care pot fi întâlnite în orice habitat normal, provin din mediul extern, respectiv din aer, sol, alimente sau de la alte animale. Unele dintre ele pot fi patogene. Adesea sunt doar în tranzit, fără să contribuie semnificativ la activitățile „ecosistemului”, la ale cărei condiții nu se pot adapta, ci în care pot doar supraviețui temporar. Un microorganism alohton se poate localiza într-o nișă eliberată de un autohton numai dacă echilibrul acesteia este perturbat, la un organism aflat într-o condiție anormală. Când sistemul revine la normal, microorganismul autohton își reocupă nișa, eliminând specia alohtonă.

Diferitele compartimente ale organismului animal aparțin din punct de vedere microbiologic la două categorii principale: sterile și contaminate. O a treia categorie o formează cele la care starea normală este de sterilitate, însă acestea pot fi contaminate temporar cu microorganisme al căror număr poate să crească în unele situații, ajungând până la starea de infecție și boală consecutivă. În aceste cavități în mod obișnuit sterile (laringe, trahee, bronhii, sinusuri nazale, esofag, stomac, porțiunea proximală a intestinului subțire, tractul urinar superior) care pot purta o microbiota tranzitorie, prezența microorganismelor și mai ales la un anumit nivel numeric, constituie granița între starea de sănătate și cea patologică. Microbiota înregistrează o dinamică permanentă în raport cu condiția organismului-gazdă, modificările fiind atât de ordin cantitativ, cât și de ordin calitativ (compoziția în specii) în raport cu diferitele particularități funcționale ale acestuia legate de vârstă, sex, stare fiziologică.

Factorii favorizanți ai colonizării cu microorganisme caracteristice microbiotei normale

Factorul determinant al colonizării îl constituie capacitatea microorganismelor de a adera la suprafața celulelor epiteliale, evitând astfel expulzarea lor. În același timp aderarea la

substratul celular stimulează creșterea și multiplicarea microorganismelor, datorită tendinței nutrienților de a se concentra la interfața solid/lichid. Aderența la un substrat celular are caracter de specificitate, în sensul că epitelile cu diferite localizări anatomice au capacități de recunoaștere și de legare a unor bacterii diferite. Procesul se bazează pe interacțiunea dintre adezinele bacteriene (structuri extraparietale specie-specifice) și receptorii complementari de pe suprafața celulelor epiteliale ale gazdei, de natură glicoproteică sau glicolipidică. Pentru ca aderența microbiană să se poată produce, este necesar să fie învinse mecanismele gazdei care se opun acestui fenomen, cum ar fi:

- producerea de sIgA care intervine în fenomenul de excludere imună;
- sinteza de lizozim care inhibă aderența;
- sinteza de analogi de receptori specifici (liberi, solubili) care se leagă de adezinele bacteriene, neutralizându-le capacitatea de aderență la celulele epiteliale (literatura de specialitate raportează și situația inversă, în care bacteriile virulente produc și elimină în mediu adezine solubile, care blochează situsurile combinate ale anticorpilor și implicit funcția acestora, de recunoaștere și marcarea pentru distrugere a agenților patogeni).

Pot interveni și alți factori accesorii de inhibare a aderenței:

- efectul antibacterian al bilei neconjugate, ceea ce explică numărul mic al bacteriilor din intestinul subțire;
- producerea de către gazdă a unor proteine chelatoare de Fe, element indispensabil metabolismului bacterian;
- existența unor situsuri anatomice neconvenabile pentru unele microorganisme (datorită condițiilor locale de pH, potential redox).

Microbiota normală a tegumentelor

Tegumentul nu constituie o nișă ecologică favorabilă creșterii microorganismelor, totuși regiunile axilară, inghinală, interdigitală oferă condiții de umiditate suficientă dezvoltării microorganismelor. În restul zonelor, microorganismele sunt asociate glandelor tegumentare:

- glandele sudoripare sunt în general lipsite de germeni, dar dacă traseul glandei este obstruat, se creează condiții pentru multiplicarea microorganismelor;
- glandele apocrine sunt glande modificate care se activează la pubertate, fiind colonizate cu microorganisme;
- foliculii piloși sunt colonizați cu numeroase specii bacteriene, frecvente fiind:

Staphylococcus epidermidis, Corynebacterium acnes.

Secrețiile glandelor sebacee și sudoripare ($\text{pH} = 4-6$) conțin substanțe nutritive favorabile creșterii bacteriilor: uree, aminoacizi, săruri, acid lactic, lipide, urme de vitamine și glucide.

Ca în orice habitat există o microbiotă rezidentă compusă din bacterii care supraviețuiesc și se multiplică și o microbiotă tranzitorie, care dispare în timp. Predominante sunt bacteriile Gram pozitive, pentru că cele Gram negative nu pot competiționa pentru substanțele nutritive; astfel se explică de ce, dacă bacteriile Gram pozitive sunt eliminate prin tratament, se creează condiții pentru dezvoltarea celor Gram negative.

Tegumentul nou-născutului este acoperit de o peliculă de *vernix caseosa*, dar colonizarea începe în timpul expulziei. Dacă inițial pH -ul tegumentar este neutru, devine acid după prima spălare, dar nou-născutul rămâne în continuare foarte sensibil la colonizarea cu germeni pentru că lipsește microbiota normală, cu rol protector împotriva germenilor patogeni (*Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*), ceea ce impune măsuri de igienă sporită (spălări dese care îndepărtează bacteriile ajunse pe piele din foliculii piloși, ca și din mediul extern).

Microbiota normală a tubului digestiv

1. Microbiota cavității bucale. Cavitata bucală este un habitat complex; secreția salivară, prin conținutul său de 0,5% substanță uscată, reprezentată de enzime, mucoproteine, proteine serice, substanțe antibacteriene (lizozim, lactoperoxidază), substanțe anorganice (ioni fosfat și bicarbonat), nu constituie un mediu optim pentru dezvoltarea microorganismelor. Totuși suprafețele dentare sunt medii favorabile dezvoltării bacteriilor înaintea erupției dentare, în acest habitat fiind prezenți streptococi și lactobacili facultativ anaerobi. După apariția dinților predomină bacteriile anaerobe adaptate suprafețelor dentare și fisurilor gingivale. Bacteriile aderă la smalțul dentar, iar proliferarea lor este dependentă de producerea glucanului (polimer insolubil al glucozei), care constituie o matrice în care bacteriile se multiplică și formează o peliculă pe suprafața dinților, numită placa dentară (impregnată cu mucoproteine și săruri anorganice). Placa dentară rezistă la periajul normal, atingând grosimi de 60 μm în zonele ascunse. În microhabitate anaerobe sunt prezente speciile *Streptococcus mutans* (care produce enzima glucozil-transferaza, responsabilă de sinteza glucanului), *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium sp.* Până la crearea condițiilor anaerobe, placa dentară este populată de microorganisme aere, facultativ anaerobe, care consumă oxigenul creând condiții de anaerobioză. Aceste microorganisme fermentează glucidele cu producere de acid lactic, care hidrolizează hidroxiapatita din smalțul subiacent și conduc la apariția cariei dentare. Prezența fluorului în smalțul dentar, crește rezistența acestuia la

hidroliză. Rolul microbiotei bucale în cariogeneză a fost stabilit prin studii asupra animalelor axenice (*germ-free*), care hrănite fiind cu o dietă bogată în glucide, dar sterilă, nu fac carii dentare.

În compoziția salivei există și factori inhibitori ai aderenței celulelor de suportul dentar prin intermediul glicocalixului:

- mucoproteinele salivare care competiționează cu cele bacteriene pentru situsurile de legare pentru bacterii la nivelul matricei plăcii dentare (au structuri chimice asemănătoare și afinitate mai mare pentru placă, decât bacteriile);
- sIgA care determină aglutinarea bacteriilor care devin astfel incapabile să mai adere la suprafața dentară;

Dimpotrivă, fibronectina - o glicoproteină (g.m. = 440 kDa) prezentă în ser, dar și în salivă (secretată de glandele salivare) și pe suprafața celulelor epiteliale ale mucoasei bucale, favorizează aderența bacteriilor Gram pozitive în special, la celulele mucoasei. Prin creșterea activității proteolitice a salivei, fibronectina poate fi scindată, ceea ce favorizează aderența bacteriilor Gram negative: *Pseudomonas sp.*, enterobacterii condiționat-patogene, responsabile de mirosul neplăcut al gurii sau *halenă*.

2. Microbiota normală a stomacului și intestinului

Colonizarea bacteriană a tractului gastrointestinal neonatal începe în timpul nașterii, când nou-născutul vine în contact cu cervixul matern și microbiota vaginală. La copiii născuți prin cezariană, bacteriile colonizatoare ale tractului gastrointestinal provin din mediu. Primele bacterii prezente la majoritatea copiilor sănătoși, sunt facultativ anaerobe și acestea rămân predominante în timpul primelor două săptămâni de viață. Speciile cele mai comune izolate din microbiota nou-născutului la naștere, aparțin genurilor: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* și *Streptococcus*. Alimentația pare să moduleze *pattern*-ul de colonizare. La om, laptele matern joacă un rol în imunitatea pasivă a nou-născutului și conține factori care stimulează creșterea speciei *Bifidobacterium bifidum* în intestin. Alimentația artificială stimulează implantarea și persistența speciei *Clostridium perfringens*. Rezultatele sugerează existența unui antagonism între *B. bifidum* și *C. perfringens*, care poate fi intensificat de tipul de alimentație.

Tractul gastrointestinal, reprezentând o suprafață de aprox. 500 m², este principalul rezervor de bacterii, estimat la un număr de aprox. 10¹⁴ celule microbiene care contaminatează suprafețele corpului (constituit din 10¹³ celule) încă de la naștere. Variații pronunțate în densitățile populaționale bacteriene sunt observate la diferite nivele ale tractului gastrointestinal. Numărul

bacteriilor ingerate este redus drastic datorită acidității gastrice. O densitate scăzută de microorganisme este menținută în intestinul subțire, mecanismul major de control al acestei populații fiind motilitatea intestinală, care face ca organismele neaderate doar să traverseze intestinul. Cele mai mari densități de bacterii sunt prezente în colon.

Structura acestor compartimente influențează colonizarea cu microorganisme, principalul factor fiind mucusul de pe mucoasa acestor cavități, care conține mucoproteine și glicolipide. Mucusul formează un film, o peliculă care se suprapune glicocalixului structural al celulelor epiteliale mucoase. Mucusul poate reprezenta un substrat nutritiv pentru acele microorganisme dotate cu un echipament enzimatic corespunzător. Conținutul cavității al stomacului și intestinului subțire proximal este steril, pentru ca microorganismele să pătrună odată cu hrana și apa sunt omorâte de pH-ul gastric foarte acid. În pelicula de mucus însă sunt prezenți lactobacili și streptococi aerotoleranți. În acest compartiment pot fi prezente levuri aparținând genului *Candida*, ca și un număr mic de bacterii anaerobe aparținând genurilor *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Veillonella*.

Bariera intestinală este un epiteliu format din mai multe tipuri de celule conectate prin legături strânse, reprezentate de: celule absorbitive columnare, celule secretorii în formă de cupă, *celule M* și *celule Paneth*. Acest ultim tip de celule, situate la baza criptelor intestinului subțire, rare pe suprafața epiteliului, sunt celule fagocitare care produc lizozim și alți produși antimicrobieni, dar funcția principală a acestor celule este de a secreta mucus care învelește suprafața mucoasei intestinale. Majoritatea celulelor epiteliale sunt *celule columnare absorbitive*, ale căror funcții majore sunt: 1) *conferirea caracterului de barieră epitelială impermeabilă fiziologic* și 2) *absorbția și transportul nutrienților*. Pe suprafața apicală (luminală) a celulelor epiteliale intestinale se găsesc structuri bine definite - «microvili», proiecții digitiforme ale membranei acestor celule, susținute de actină. Anumiți patogeni aderă la microvili și nu deformează membrana. Alți patogeni alterează suprafața apicală, adesea distrugând microvili și furnizând astfel patogenilor o suprafață suplimentară de aderență. *Salmonella sp.* denudează microvili, celulele deformate devenind mai sensibile la invazia bacteriană.

Produșii metabolici bacterieni pot afecta viabilitatea celulelor-gazdă sau funcțiile acestora, dar influențează și localizarea altor microorganisme în comunitățile aderente. Unele bacterii au capacitatea de a penetra membrana celulelor-gazdă pe care le invadează. Astfel de patogeni invazivi pot fi enterobacteriile patogene (*Salmonella sp.*), dar și unii membri nepatogeni (condiționat-patogeni) ai microbiotei intestinale normale, care trec din lumenul intestinal în

tesutul subepitelial, prin procese de endocitoză/exocitoză realizate de către celulele M (*microfold*) din epiteliul care acoperă plăcile Peyer (care sunt mai proeminente în ileum), diferite ultrastructural de celulele absorbitive învecinate.

Anumiți patogeni ai mucoasei intestinale sunt incapabili să adere la suprafața apicală a celulelor epiteliale polarizate; de ex., *Yersinia sp.*, *Shigella sp.* interacționează specific numai cu suprafața bazolaterală a acestora, ceea ce constituie o curiozitate din moment ce această suprafață nu este expusă patogenilor exogeni. Una din ipotezele care încearcă să explice fenomenul este aceea că acești patogeni atrag leucocitele PMNN printr-un efect chimiotactic pozitiv, iar acestea, în mișcarea lor către bacterii, realizează breșe în bariera epitelială, desfăcând joncțiunile strânse, moment în care bacteriile sunt internalizate sau pătrund printre celule, ajungând la suprafețele bazolaterale ale acestora, la nivelul receptorilor specifici.

Celulele M, un tip unic de celule, formează 10 % dintre celulele epiteliului intestinal la om și șoarece, fiind dispersate prinre celulele absorbitive și cele ale epiteliului asociat foliculilor limfatici și atașate celulelor adiacente prin joncțiuni strânse. Suprafața apicală a celulelor M prezintă microvili (margine în perie) scurți, neregulați, iar cea antiluminală este invaginată pentru a forma un buzunar central, în care migrează limfocite și macrofage. Nivelele scăzute ale conținutului în enzime digestive al acestor celule este un indiciu ca funcția lor esențială nu este cea digestivă. Morfologia lor sugerează funcția de transport transepitelial al moleculelor și particulelor nedigerate. Materialul transportat este probabil prezentat celulelor limfoide, rol sugerat de apropierea strânsă dintre aceste celule și diferite CPA (celule prezentatoare de antigen) care prelucrează antigenele prezente în buzunarul lor central. Acest sistem de transport și prelucrare a antigenelor, devine o cale de invazie pentru unii patogeni enterici bacterieni care utilizează mișcarea transepitelială prin celulele M ca poartă de intrare prin bariera intestinală. Exemple de astfel de patogeni : *Yersinia sp.*, *Shigella flexneri*, *Salmonella sp.* (salmonellele pot pătrunde și prin celulele columnare), *Campylobacter jejuni*, tulpini de *E. coli* enteropatogene.

În contradicție cu necesitatea existenței unei bariere fiziologice (furnizată de celulele columnare), protecția gazdei prin procese imunologice necesită ca macromoleculele și microparticulele să aibă o cale de penetrare a acestei bariere, spre sistemul limfoid asociat intestinului reprezentat de plăci Peyer, foliculi limfatici izolați, apendice și noduli limfatici mezenterici, care alcătuiesc împreună sistemul GALT (*Gastric Associated Lymphoid Tissue*). Prin infectarea experimentală a iepurelui cu o tulpină enteropatogenă de *E. coli*, s-au studiat la microscopul electronic de baleiaj modificările produse ca urmare a aderenței bacteriilor la mucoasa intestinală (fig. 1).

Microbiota intestinală complexă și relațiile sale cu organismul gazdă au fost asemănată cu un ecosistem, în care micropopulația indigenă protejează organisme umane și animale împotriva colonizării cu bacterii alohtone invadatoare. Încă din timpul lui Metchnikoff acest fenomen a fost observat și descris ca "antagonism bacterian", "efect de barieră" sau "rezistență la colonizare". Prin activitățile lor

metabolice, prin interacțiunile dintre ele, ca și cu cele alohtone, microorganismele autohtone se opun aderenței și colonizării mucoasei intestinale cu microorganisme patogene (pătrunse de la exterior odată cu alimentele, apa, aerul), contribuind prin aceasta la starea de sănătate a gazdei.

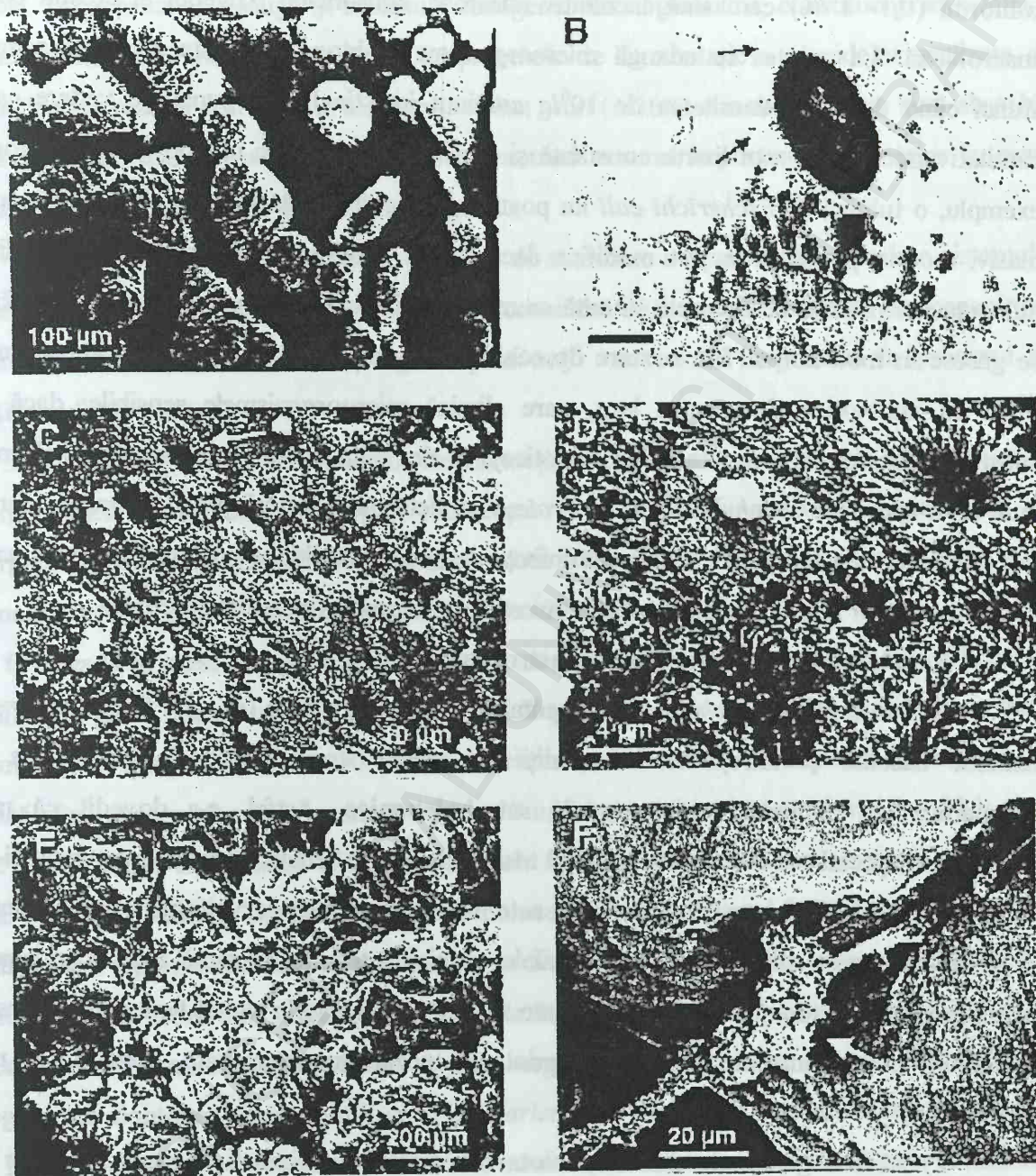


Fig. 1. Imagini la microscopul electronic de baleiaj (A, C - F) și de transmisie (B) ale unor fragmente de intestin de iepure, după 24 de ore de la infecția cu o tulpină de *E. coli* enteropatogenă la iepure REPEC O103 ; A) - microvili ileali cu aspect normal ; B) - în timpul stadiilor timpurii ale infecției, bacteriile exprimă structuri de suprafață fibrilare care realizează o aderență inițială laxă la celulele gazdă epiteliale (bara = 1 μm); C și D - ca răspuns la infecție, microviliile enterocitelor de pe suprafața plăcilor Peyer prezintă structuri neregulate *bowl-like* (în formă de cupă sau bol); E - F - o rețea de agregate de bacterii intim asociate unui material mucoid flocular sau filamentos care acoperă o parte a epitelului (după Heczko și col., 2000).

3. Microbiota colonului. În intestinul gros microbiota realizează densități mari (10^{11} /g conținut colonic), 99% dintre bacteriile componente fiind anaerobe (sute de specii, dintre care puține sunt cultivate și identificate). Condițiile de anaerobioză sunt create de *Escherichi coli* și germenii coliformi (0,1- 1 %) care sunt facultativ anaerobi, consumând oxigenul și creând condiții de anaerobioză. La acestea se adaugă microorganisme alohtone, prezența lor fiind semnificativă atunci când depășesc densitatea de 10^6 /g conținut intestinal. Din punct de vedere calitativ și cantitativ microbiota este foarte constantă și rezistă aportului de microorganisme exogene. De exemplu, o tulpină de *Escherichi coli* nu poate fi înlocuită de altă tulpină, chiar dacă aportul este masiv. Aceste populații se pot modifica dacă au loc modificări biochimice ale epiteliului, sub influența hormonală, de exemplu. O altă cauză a modificării microbiotei normale ale cărei specii se găsesc în mod normal într-o stare de echilibru, numită *eubioză*, poate fi tratamentul pe cale orală cu antibiotice de spectru larg, care elimină microorganismele sensibile; dacă dieta nu substituie aceste pierderi (produse probiotice), se dezvoltă excesiv microorganismele rezistente, cum ar fi specii de *Staphylococcus* și *Proteus* ce determină infecții dificil de tratat, dar și levuri (ex: *Candida albicans*) care determină infecții denumite candidoze postantibioterapie, ca rezultat al debalansărilor numerice dintre speciile microbiotei normale (stare de *disbioză*).

Rolul fiziologic al microbiotei gastrointestinale

A fost studiat și dovedit experimental pe animale axenice (gr. *a* = fără, *xenos* = străin) – animale născute și întreținute în condiții de mediu steril, lipsite de microbiota normală, comparativ cu animalele convenționale sau holoxenice. Astfel, s-a dovedit că microbiota normală, în special cea intestinală, exercită mai multe efecte benefice asupra organismului-gazdă:

1) Microbiota intestinală normală este absolut necesară dezvoltării normale a intestinului; o dovadă în acest sens este că la animalele axenice intestinul prezintă modificări anatomice și histologice, fiind aton și cu o funcționalitate subnormală; efectele par să fie legate de absența unor metaboliți microbieni care stimulează, printr-un mecanism necunoscut, dezvoltarea normală a intestinului;

2) Microorganismele din microbiota intestinală sintetizează o gamă largă de vitamine, cum ar fi: tiamina, piridoxina, acidul folic, acidul pantotenic, biotina, riboflavina, vitamina K și vitamina B₁₂. Nu se cunoaște exact în ce măsură aceste vitamine sunt folosite și de organismul-gazdă, deoarece locul lor de producere - mai ales colonul, nu este specializat în absorbție;

3) Rolul microbiotei intestinale în digestie - rol major în cazul mamiferelor rumegătoare, în timp ce la om acest rol este accesoriu; astfel procesul de digestie poate continua în colon sub

acțiunea microorganismelor pentru alimente nedegradate (pentru care nu există enzime specifice) sau degradate parțial în etajele superioare (stomac, intestin subțire), cum ar fi celuloza, hemiceluloze, amidon, proteine, acizi nucleici, glucide cu moleculă mică, ca de exemplu stahioza din fasole. La acestea se adaugă și molecule endogene: imunoglobuline, constituenți ai celulelor epiteliale descumate, mucus intestinal. Din procesele de fermentație a glucidelor realizate de bacteriile lactice rezultă acid lactic și acizi grași cu lanț scurt (AGLS), din care o parte sunt absorbiți și metabolizați de către organismul-gazdă, reprezentând o sursă importantă de energie în cazul persoanelor cu o alimentație bogată în fibre vegetale;

4) Microbiota normală exercită și un efect de stimulare a dezvoltării normale a sistemului imunitar și a reacțiilor de apărare ale gazdei. Se consideră că bacteriile indigene din organismul mamiferelor constituie un set de antigene *quasi-self* cu un rol important în procesul de diferențiere a limfocitelor B.

5) Prin activitățile lor metabolice, prin interacțiunile dintre ele, ca și cu cele alohtone, microorganismele autohtone se opun aderenței și colonizării mucoasei intestinale cu microorganisme patogene, contribuind și prin aceasta la starea de sănătate a gazdei. Acest efect este denumit "efect de barieră antiinfecțioasă" sau "rezistență la colonizare".

O dovadă în acest sens au adus studiile pe animale axenice (= engl. *germ-free* = libere de germeni), care pot fi infectate foarte ușor *per os* cu *Shigella flexneri* sau cu *Salmonella enteritidis*, doza infectantă minimă fiind de 10 celule bacteriene; acestea se localizează în intestin, se multiplică până ating o densitate maximă de 1 – 10 mld./ g conținut intestinal în 12 – 24 h, după care se stabilizează. În aceleași condiții, animalele holoxenice, purtătoare ale unei microbiote normale complexe, elimină bacteriile infectante cu aceeași viteză cu care îndepărtează un marker de control inert (spori aparținând unei tulpini termofile de *Bacillus subtilis* care nu germinează în organismul gazdă). Doza infectantă în acest caz este de 10^6 celule de *Salmonella enteritidis*. Acest fenomen prin care microbiota normală a unui organism holoxenic se opune colonizării cu microorganisme alohtone, este denumit *efect de barieră* sau *rezistență la colonizare* (Ducluzeau, 1970). După unii autori, rezistența la colonizare, numită și *excludere competitivă* este considerată un caz particular al efectului de barieră, constituind un mecanism exercitat de bacteriile intestinale indigene, care controlează colonizarea intestinală de către microorganismele patogene sau potențial patogene și fiind considerat un mecanism esențial, deficitar în cazul organismelor compromise din punct de vedere imunologic. Se apreciază că rezistența la colonizare ar manifesta trei grade de intensitate, care conduc la :

- 1) **eliminarea rapidă** a microorganismelor străine;
- 2) **bariera permisivă**, care asigură menținerea temporară a microorganismelor alohtone, inofensive pentru gazda care devine astfel «purtător»;
- 3) **efect curativ**, de îndepărtare a microorganismelor străine în câteva zile – acest tip de răspuns poate fi exploatată în favoarea omului (de ex., cu tulpini probiotice).

Datorită funcției de barieră, majoritatea încercărilor de implantare a unor bacterii străine sunt abortive. De exemplu, se recomandă în timpul tratamentului sau postantibioterapie introducerea iaurtului în dietă, produs de fermentație care conține celule vii de *Lactobacillus bulgaricus*. Ori, lactobacilii izolați din materiile fecale după tratament, nu sunt cei introduși (cu care se pot confunda), ci aparțin unor tulpini indigene a căror creștere este stimulată de alimentația lactată.

Mecanismele rezistenței la colonizare sunt următoarele:

1) Antagonismul microorganismelor indigene față de patogeni are un rol esențial și se datorează acțiunii sinergice a mai multor bacterii din microbiota normală și antagoniste față de cele alohtone;

a) antagonism nespecific – prin producerea de către microorganismele indigene a unor metaboliți toxici: acizi grași volatili, H_2S , substanțe inhibitorii ale creșterii (de ex. acid lactic);

b) antagonism specific – prin producerea de bacteriocine sau alte tipuri de substanțe antibiotice; argument: streptococii α -hemolitici tip *viridans* din faringe, producători de bacteriocine, împiedică implantarea speciilor patogene; îndepărtarea streptococilor α -hemolitici cu antibiotice creează un vid ecologic și este urmată de colonizarea orofaringelui cu specii patogene, cum ar fi: *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, dar și *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *Candida albicans*;

2) producerea de modificări fizico-chimice ale mediului (pH, potențial de oxidoreducere) care fac anumite nișe ecologice improprii pentru colonizare;

3) inhibarea fenomenului de aderență microbiană la substratul celular sensibil, o precondiție *sine qua non* a proceselor de colonizare și infecție consecutivă; mecanismul are la bază competiția pentru situsurile de aderență, fapt dovedit de numeroase observații microscopice care au evidențiat celule bacteriene aderente la tegumente și mucoase;

4) degradarea toxinelor bacteriei patogene de către microorganismele autohtone; acest mecanism explică diferențele de toxicitate între toxinele administrate *per os* și parenteral;

5) competiția pentru nutrienți are un rol minor, microbiota intestinală utilizând substanțe din dietă (supuse hidrolizei, fermentației), nedegradate de enzimele gazdei.

Datorită efectului de barieră antiinfecțioasă la nivelul tubului digestiv, microbiota intestinală normală se opune instalării și proliferării bacteriilor vii ingerate de către gazdă. În literatura de specialitate există un număr restrâns de date privitoare la bacteriile care exercită un efect de barieră în tubul digestiv al unui organism holoxenic. Această carență a cunoștințelor se explică prin necesitatea și dificultatea în același timp de a dispune de animale axenice care, înșămânțate cu bacterii cunoscute, devin organisme și modele de studiu gnotoxenice (- biotice), care permit evaluarea comparativă a efectului de barieră a diferitelor specii bacteriene. Astfel de modele sunt necesare pentru că studiul *in vitro* al interacțiunilor interspecifice la bacterii nu permite extrapolarea rezultatelor asupra interacțiunilor care se petrec *in vivo* în tubul digestiv al animalelor gnotoxenice. De ex.: *Shigella flexneri* este sensibilă *in vitro* la aciditatea organică; *in vivo*, prin asocierea speciei *S. flexneri* cu *Bacteroides sp.*, care produce acid acetic în cantități suficiente pentru a inhiba *in vitro* dezvoltarea unei culturi de *S. flexneri*, se constată lipsa oricărui efect inhibitor exercitat de *Bacteroides sp.* asupra *S. flexneri*. În alte cazuri efectul de barieră se manifestă atât *in vitro* cât și *in vivo*: de ex., anumite tulpini de *E. coli* față de *S. flexneri*.

Dar nici modelele gnotoxenice (respectiv dixenice) nu sunt echivalente celor holoxenice; un argument în acest sens îl constituie faptul că *E. coli* elimină *S. flexneri* la șoarecii dixenici, dar nu și în cei holoxenici; la șoarecii holoxenici este stabilit că bacteriile cu efect de barieră împotriva speciei *S. flexneri* sunt strict anaerobe, sporulate, care fac parte din micropopulația dominantă a tubului digestiv (acestea exercită și un efect de barieră drastic împotriva bacteriei anaerobe patogene *Clostridium perfringens*).

Nu întotdeauna primul ocupant al tubului digestiv are efect de barieră; astfel, celulele de *Lactobacillus casei* dintr-un preparat comercial sunt eliminate de către *E. coli*.

Astfel de studii evidențiază și alte aspecte ale efectului de barieră: *Bacillus licheniformis* produce *in situ* în partea superioară a tubului digestiv (stomac sau duoden) o substanță antibiotică asemănătoare bacitracinei, inhibitoare a colonizării cu *Clostridium perfringens*. Când acest antibiotic este produs *in situ* nu se observă niciodată apariția de mutante rezistente la acest antibiotic. *B. licheniformis* asociat cu *Lactobacillus sp.* nu mai produce acest antibiotic, deși supraviețuiește în număr mare. Uneori este importantă și ordinea în care se face colonizarea: de exemplu, dacă prima bacterie colonizatoare este *C. perfringens* și apoi *B. licheniformis*, aceasta din urmă nu produce antibioticul, cele două bacterii coexistând fără să interfere. Efectul de barieră poate fi modificat de dieta gazdei (fermentarea lactozei are loc în cecum cu producere de acid lactic; glucoza este rapid absorbită și astfel efectul său este diferit).

Un alt tip de efect de barieră (al cărui mecanism este necunoscut) se manifestă prin persistența unei tulpini date în micropopulația subdominantă; un exemplu în acest sens îl oferă *E. coli* care nu este eliminată, dar mărimea populației nu depășește densitatea de 10^6 celule/ g de materii fecale proaspete (maximum 1% din totalul microbiotei intestinale), acesta fiind considerat un exemplu de barieră permisivă. În concluzie, anumite bacterii intestinale exercită în ecosistemul gazdă – microbiota tubului digestiv fie un efect drastic conducând la eliminare, fie permisiv asupra bacteriilor exogene, efectul permisiv manifestându-se în special asupra bacteriilor potențial patogene. Acest mecanism de apărare de care dispune gazda pentru a se opune agresiunilor bacteriene este încă insuficient explorat. În domeniul microbiologiei medicale, s-a conturat în ultimul timp o concepție ecologică în studiul agenților infecțioși în interacțiune cu gazda lor.

Importanța funcției de barieră antiinfecțioasă este demonstrată de numeroase observații:

- microbiota intestinală inhibă creșterea unor patogeni importanți, cum ar fi: *Vibrio cholerae*, *Salmonella sp.*, *Shigella dysenteriae*; suprimarea microbiotei normale cu antibiotice reduce semnificativ rezistența față de aceste bacterii patogene;
- suprimarea microbiotei bucofaringiene normale cu antibiotice este urmată de instalarea promptă a unor bacterii patogene: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*.
- microorganismele rezidente în regiunea endocervicală uterină (*Lactobacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Neisseria sp.*, *Candida albicans*) inhibă activitatea metabolică și implantarea speciei patogene *Neisseria gonorrhoeae*.

Rolul de barieră antiinfecțioasă, ca și cel de stimulare a mecanismelor imunitare (demonstrat la animalele axenice care prezintă leucopenie, fagocite hiporeactive, țesut limfoid subdezvoltat, titru scăzut de anticorpi și interferoni) demonstrează că microbiota intestinală normală protejează organismul gazdă față de infecțiile cu un număr moderat de patogeni enterici, pătrunși pe cale bucală (rol similar și în cazul microbiotei din alte situsuri).

Între speciile permanente se păstrează proporții constante, microbiota având un grad de stabilitate, manifestată între altele și prin dificultatea implantării de tulpini noi. Populațiile de microorganisme din sistemul digestiv împreună cu gazda alcătuiesc un sistem ecologic, al cărui echilibru este absolut necesar pentru sănătatea individului, fapt demonstrat de abolirea acestui efect prin administrarea de antibiotice.

Din punct de vedere ecologic, declanșarea unei infecții intestinale este consecința a două fenomene care au loc simultan: 1) pătrunderea unui agent infecțios în intestin; 2) supresia efectului de barieră și a funcției sale de a se opune implantării și multiplicării bacteriilor

patogene. Cunoașterea mai în detaliu a bacteriilor cu rol de barieră, a substanțelor produse, constituie premise pentru eliminarea unui efect nedorit, ca și pentru implantarea unor tulpini adecvate la nou-născut.

Microorganisme probiotice. Termenul a fost utilizat pentru prima dată în 1965 și se utilizează încă, deși semnificația sa a variat în timp; în 1974 prin acest termen se înțelegea orice supliment alimentar cu efect asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale. În 1989 Fuller a dat o altă accepțiune termenului: orice organism viu adăugat alimentelor, care influențează benefic organismul gazdă, prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din tubul digestiv. Preparatele probiotice, sub diferite forme (capsule, granule sau suspensii adăugate în hrană), pot conține unul sau mai multe tipuri de bacterii, cum ar fi : *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus thermophilus*. Modul lor de acțiune este direct, printr-un efect antagonist datorat producerii de substanțe antimicrobiene (acizi organici care determină scăderea pH-ului, H_2O_2 , substanțe bacteriocine – like, biosurfactanți), competiției pentru nutrienți sau pentru situsurile de atașare la substratul celular, care previne colonizarea acestuia cu bacterii patogene (este demonstrat că aderă și celule omorâte de lactobacili). Probioticele mai pot acționa prin modificări metabolice, prin stimularea imunității (activarea macrofagelor, stimularea sintezei de anticorpi).

Efecte : -stimularea creșterii organismului gazdă (prin îmbunătățirea conversiei hranei și protecția împotriva infecțiilor intestinale, contribuind la reducerea ratei morbidității și mortalității);

- înlocuirea antibioticelor și aditivilor chimici sintetici la animalele de crescătorie;
- atenuarea fenomenului de intoleranță la lactoză (deficitul de β - galactozidază al gazdei este compensat de prezența acestei enzime în echipamentul enzimatic al bacteriilor lactozo-fermentative) ;
- se consideră că speciile de *Lactobacillus* ar avea și un efect anticancerigen (prin supresia nitrat-reductazei și a formării nitrozaminelor);

Există și situații în care microorganisme care nu fac parte din ecosistemul tubului digestiv

pe care îl tranzitează, exercită totuși un efect antagonic (preventiv sau curativ):

- administrarea preventivă a speciei *Saccharomyces boulardii* reduce mortalitatea șobolanilor gnotoxenici inoculați oral cu *Clostridium difficile*, la care se observă scăderea producției de citotoxină, în timp ce numărul celulelor este puțin modificat;
- glucanul din peretele celular al levurilor (*Saccharomyces cerevisiae*) activează complementul și fagocitele, având un efect protector în infecțiile bacteriene, fungice și parazitare;
- produșii de metabolism stimulează creșterea lactobacililor indigeni.

Rolul negativ al microbiotei intestinale

1. Microbiota colonului este semnificativă pentru patologie, determinând infecții oportuniste, când integritatea peretelui celular este compromisă, infecțiile fiind complicații severe postoperatorii (apendicite, diverticulite), multe dintre acestea fiind de origine endogenă. Numeroase bacterii indigene se pot comporta ca «oportuniste», determinând complicații mai ales la persoanele imunosupresate sau ca «invadatori secundari» după unele infecții grave.

2. Translocația bacteriilor din intestin este un fenomen de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal în ganglionii mezenterici, prin epiteliul intestinal intact, mai exact prin enterocite (celulele absorbitive), spre membrana bazală a mucoasei intestinale, ajungând în canalele limfatice sau direct în ficat și alte organe, pe cale vasculară. Mai rar, este posibilă migrarea retrogradă, în plămân. Deci translocația este urmată adesea de localizarea bacteriilor în diferite situsuri extraintestinale și are loc mai ales la persoanele imunosupresate, expuse unor traumatisme mari sau unor intervenții chirurgicale, conducând la complicații infecțioase grave, adesea sistemice și cu o rată mare a mortalității.

Fenomenul este semnalat exclusiv la bacteriile aerobe, facultativ anaerobe, cum ar fi: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Candida albicans*. La acestea se adaugă *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* care supraviețuiesc sau se multiplică în macrofage, putând să fie transportate în situsuri extraintestinale. Bacteriile strict anaerobe nu sunt translocate în mod normal, dar pot fi translocate împreună cu bacteriile strict și facultativ aerobe, la organisme la care integritatea mucoasei intestinale este grav afectată (prin iradiere masivă, arsuri grave, ischemie mezenterică acută) și abolite mecanismele care controlează translocația selectivă.

Bacteriile anaerobe nu se pot lega de situsurile receptoare ale enterocitelor, ci pot migra doar prin epiteliul lezat. Raportul dintre bacteriile anaerobe și cele aerobe (strict sau facultativ) în intestin variază între 100:1 și 1000:1, ceea ce demonstrează că translocația nu este dependentă de densitate. Rolul bacteriilor strict anaerobe în ecologia intestinală este acela de a limita multiplicarea excesivă și translocația bacteriilor aerobe potențial patogene urmată de colonizarea unor situsuri extraintestinale, prin mecanismul rezistenței la colonizare. Din acest unghi de vedere, translocația ar fi determinată de incapacitatea bacteriilor strict anaerobe de a-și exercita această funcție de control.

3. Demnă de analizat este și relația cauză – efect între microbiota normală – cancer; s-a sugerat adesea că bacteriile intestinale pot juca un rol în inițierea cancerului de colon, prin

producerea de carcinogeni, cocarcinogeni și procarcinogeni. În această relație se poate vorbi de o corelație directă sau indirectă.

Corelație directă. Astfel, în etiologia maladiei Whipple, numită inițial lipodistrofia intestinală sau histioreticuloza gravă intestinală, caracterizată din punct de vedere anatomic prin depozite de grăsime în ganglionii mezenterici și clinic prin steatoree, ascită chiloasă, poliartrită, subfebrilitate, denutriție progresivă, pigmentația mucoasei bucale, manifestări neurologice, a fost implicată bacteria *Corynebacterium anaerobium*, identificată în 1992 prin metode moleculare (PCR) ca o specie nouă, denumită *Tropherima whippelii*.

Corelație indirectă. Se acceptă că majoritatea cancerelor umane au în etiologia lor și un factor de mediu; astfel, multe forme de cancer sunt legate de alimentație. Microbiota intestinală joacă un rol cheie ca intermediar în această relație, producând în cursul metabolismului substanțe cancerigene și promotori. De exemplu, **metabolismul unor aminoacizi poate conduce la apariția unor compuși cancerigeni:**

- *metionina in vitro* este metabolizată sub forma analogului său *S-etil etionina*, de către unele specii bacteriene (inclusiv specii componente ale microbiotei intestinale normale), când sunt cultivate pe medii cu săruri minerale și glucoză, îmbogățite cu sulfați și metionină. Se pare că etionina ar avea un rol în cancerogeneza colonului;

- *tirozina* este metabolizată de către microbiota intestinală, rezultând *fenoli volatili* (fenol, p-crezol, 4-etil-fenol), care sunt absorbiți din intestin și excretați în urină. Un om sănătos excretă 50 – 100 mg de fenoli volatili urinari/zi (mai ales p-crezol). S-a demonstrat experimental că aplicarea locală de fenoli induce dezvoltarea cancerului de piele la șoareci. Fenolii volatili produși de bacterii au fost puși în evidență în suc intestinal, urină și fecale la bolnavii care conțin în intestinul gros o populație bacteriană foarte abundentă și densitatea lor este în funcție de alimentația proteică și de durata tranzitului intestinal;

- *triptofanul* este metabolizat în ficat și sub influența microbiotei intestinale, produșii rezultați fiind eliminați în urină. Anumiți cercetători afirmă că metaboliți ai triptofanului ar fi implicați în producerea cancerului vezicii urinare la om.

Formarea N-nitrozo compuşilor – *in vivo* acești compuși se formează din nitriți și compuși aminați, în mediu acid sau neutru, sub acțiunea enzimelor bacteriene. Această transformare poate avea loc oriunde, dacă nitriții, compușii aminați nitrozabili și bacteriile coexistă. N-nitrozaminele au fost puse în evidență în salivă, stomac, colon, vezica urinară și vagin, dar sunt reținute datorită caracterului lor organotrop, numai dacă sunt activate local. Studii epidemiologice au ajuns la concluzia că în zonele unde se consumă cantități mari de nitrați, incidența cancerului gastric este mai mare decât la persoanele cu dieta saracă în nitrați. Nu se știe

dacă stomacul este organul țintă pentru toate nitrozaminele produse în organism sau dacă nitrozaminele produse la acest nivel sunt activate local de microbiota gastrică. Prin alimentație se consumă în general o cantitate mică de nitriți, dar nitrații aflați în alimente în cantități destul de mari, sunt reduși la nitriți de către unele specii bacteriene (de ex. enterobacterii). Prin cuplarea nitriților cu aminele alimentare și cu cele secundare utilizate ca prezervanți, rezultă *nitrosamine* cancerigene. După unii autori, riscul ar fi minor deoarece nitrații ar fi absorbiți înainte de a ajunge în contact cu microbiota intestinală. N-nitrozo compuși (N-nitrozamine care sunt organotrope și induc tumori în organele specifice și N-nitrozamide care sunt direct cancerigene) formează un grup de substanțe cu puternic efect carcinogen asupra tuturor speciilor animale testate, fiind astfel greu de crezut că specia umană ar face excepție.

Etiologia cancerului colo-rectal este explicată în prezent prin ipoteza multifactorială, riscul individual pentru această boală fiind determinat de factori genetici, dar apariția acestei forme de cancer ar putea fi mediată și de bacterii, în funcție de factorii alimentari. Incidența cancerului de colon și a colopatiilor este redusă la populația care consumă o dietă bogată în fibre vegetale, comparativ cu cea care are o alimentație bogată în grăsimi animale și proteine. Regimul alimentar, mai precis carnea și grăsimile, se pare că participă la geneza acestei boli, deși nu au fost detectate substanțe alimentare carcinogene care să explice distribuția cazurilor. De exemplu, cantități mari de grăsimi în dietă, determină preponderența speciilor bacteriene intestinale capabile să descompună aceste substanțe. Experimental, s-a reușit să se sintetizeze un compus aromatic policiclic din steroizii biliari, care devine cancerigen sub acțiunea bacteriilor anaerobe din microbiota intestinală: *Bacteroides fragilis*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium butyricum*. În zonele cu incidență scăzută a cancerului de colon se găsește un număr mai mic de germeni anaerobi din genul *Bacteroides* și un număr mai mare de enterococi (*Enterococcus faecalis*) – germeni aerobi, facultativ anaerobi.

S-au realizat studii privind rolul microbiotei intestinale și al compoziției acesteia, la populații care prezintă un risc crescut de cancer de colon, corelat cu tipul de dietă specifică la loturi de indivizi aparținând populației japonezo-hawaiene cu polipi și la loturi martor de indivizi japonezo-hawaieni cu dietă de tip occidental, caucazieni cu dietă de tip occidental și japonezi din mediul rural cu dietă de tip tradițional. Densitatea mare a populațiilor de *Bacteroides sp.* și surprinzător, *Bifidobacterium sp.*, au fost asociate cu un risc crescut pentru apariția cancerului de colon. Anumite specii de *Lactobacillus* și specia *Eubacterium aerofaciens* (bacterie anaerobă) care de asemenea produce cantități importante de acid lactic, s-au dovedit a fi asociate cu un risc

scăzut în apariția cancerului de colon.

De asemenea, s-au efectuat studii comparative privind compoziția în specii a microbiotei intestinale dominante la bolnavii cu cancer de colon, cu alte cancere în afara localizării gastro-intestinale și cu boli nemaligne. Bolnavii cu cancer de colon și cu boli nemaligne nu diferă în privința numărului total de aerobi și anaerobi. La bolnavii cu cancer de colon predomină microbiota aerobă și scade numărul cocilor anaerobi, ca și a bacteriilor din genurile *Eubacterium* și *Fusobacterium*. S-a demonstrat că speciile aerobe pot să producă mai ușor amine, decât bacteriile anaerobe nesporulate. Deci bacteriile aerobe asigură substratul, respectiv aminele, care intră apoi în reacția de nitrozare cu nitrații.

* Există date care arată că infecțiile bacteriene acute la bolnavii canceroși ar influența favorabil desfășurarea bolii și supraviețuirea, iar administrarea de vaccinuri bacteriene (imunomodulatori de tipul *Cantastim*, *BCG*, *Corynebacterium parvum*) ar avea un efect mai bun, comparativ cu infecțiile naturale. Datele epidemiologice din „era antibioticelor” arată că în țările dezvoltate și în curs de dezvoltare, pe măsură ce incidența infecțiilor a scăzut, incidența cancerului a crescut. Literatura de specialitate menționează date privitoare la frecvența scăzută a metastazelor în cazurile de melanom din Africa, unde incidența tumorii primare este mare, dar adesea leziunile sunt suprainfectate și ulcerate. Aceste afirmații se bazează pe ideea că orice factor supresor al sistemului imunitar poate să determine o incidență crescută a cancerului, iar cei care îl stimulează, cum ar fi infecțiile bacteriene, pot reduce incidența cancerului și pot reprezenta în același timp și modalități terapeutice ale acestuia. Există date, chiar dacă nu suficient argumentate, care încearcă stabilirea unei corelații între incidența cancerului și cea a bolilor infecțioase, ca și cu utilizarea antibioticelor și a antipireticelor. Agenții infecțioși stimulează sinteza de γ - interferon, cu efect antitumoral, de către limfocitele T activate și de factor pirogen endogen- de către macrofagele activate, care determină reacția de febră, considerată a avea efect pozitiv, atât în apărarea antiinfecțioasă, cât și în cea antitumorală.

Microbiota normală a tractului respirator

La om, epiteliul căilor respiratorii are o suprafață de aprox. 70mp, expusă zilnic volumului de aer inspirat, care variază între 10.000 – 20.000 l, aer care este mai mult sau mai puțin încărcat cu microorganisme. Tractul respirator superior (nazofaringe, orofaringe) este colonizat cu numeroase specii aparținând genurilor: *Staphylococcus* (inclusiv *S. aureus*), *Streptococcus* (inclusiv *S. pneumoniae*), *Branhamella* (denumire actuală *Moraxella*, de ex. *M. catharralis*), *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Candida*. Microorganismele se găsesc în secrețiile mucoase locale (produse de glandele acinoase submucoase), pătrunse odată cu aerul inspirat, fiind oprite la nivelul epiteliului nazal datorită secreției nazale aderente și perilor care tapetează cavitățile nazale inferioare. În multe situații trec de această barieră a etajului nazal, strabat laringele și ajung în trahee, unde sunt oprite de secrețiile mucoase care se deplasează ascendent datorită activității cililor celulelor epiteliale (200 cili/ celulă), spre orofaringe, fiind apoi

înghițite. Un număr mic de bacterii pătrund în arborele traheobronșic, sub formă de picături cu diametrul de $\sim 10 \mu\text{m}$ și imediat bacteriile sunt fagocitate de către macrofagele pulmonare și alveolare, astfel că plămânul este practic un organ steril. Aerul expirat (la iepure) mai conține 0,4% din microorganismele inspirate. Există și microorganisme rezistente la fagocitoză: *Mycobacterium tuberculosis* (rezistă la digestia intracelulară) și *Streptococcus pneumoniae* (stratul capsular gros se opune fazelor de aderență și ingestie consecutivă ale procesului de fagocitoză). La punctele de bifurcare ale arborelui traheobronșic mai ales, se găsesc foliculi limfoizi solitari, ca și limfocite intraepiteliale (cu fenotip de limfocite Th și Tc/s), componente ale sistemului BALT (*Bronchus associated lymphoid tissue*) de apărare a mucoasei respiratorii. Acumularea mucusului în căile aeriene mai largi, ca și iritarea mecanică sau chimică a acestora, declanșează reflexul de tuse și eliminarea acestei secreții încărcate cu microorganisme.

Microbiota normală a tractului genito-urinar

La femeie uretra este sterilă, în timp ce la bărbat treimea inferioară a acesteia este contaminată cu specii ale genurilor *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* (prezenți și în vagin), *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, bacterii anaerobe și bacterii Gram negative neidentificate. În tractul genito-urinar feminin, lactobacilii (numiți și bacili Döderlein) fermentează glicogenul eliminat de celulele epiteliale, cu formare de acid lactic, care determină scăderea locală a pH-ului, cu rol protector, antiinfecțios (bacteriile patogene fiind, în general, neutrofile). Acest mecanism lipsește până la pubertate și dispare după menopauză, lactobacilii fiind înlocuiți de alți germeni (stafilococi, streptococi, colibacili).

Relațiile dintre microorganisme și macroorganism (organismul gazdă)

Au fost descrise mai multe tipuri de relații între speciile de microorganisme, care aparțin la trei categorii principale: neutre, benefice (comensalismul, protocooperarea, sinergismul, sintrofia, mutualismul, simbioza) și de tip antagonist (competiția, amensalismul sau antibioza, predatorismul și parazitismul). Aceste relații se pot manifesta atât între speciile microbiene din mediul natural, cât și între speciile colonizatoare (autohtone sau alohtone) ale organismului animal/uman. Pentru starea de sănătate/boală a gazdei mai importante sunt relațiile microbiotei cu organismul gazdei, deși nu pot fi neglijate nici cazurile când microorganismele se sprijină în producerea unui efect pozitiv/negativ asupra gazdei sau dimpotrivă competiționează, de ex. microorganismele ce compun microbiota normală aflate în raporturi numerice echilibrate sau microorganismele probiotice care competiționează cu speciile

patogene, cu efect profilactic/ curativ al unor infecții. Principalele tipuri de relații dintre microorganisme și gazdă (organismul animal/uman) sunt: **comensalismul**, **simbioza**, **oportunismul și parazitismul**.

Comensalismul (ecto-, endo-) – etimologic termenul derivă din cuvintele grecești *co mensa* = la aceeași masă. Această relație este notată, pe baza efectului direct pe care îl are o specie asupra speciei asociate, cu semnele (+/ 0), o specie beneficiind de pe urma celeilalte fără a o influența. Microorganismele trăiesc și se hrănesc în strânsă relație cu gazda, dar nu pe seama țesuturilor sale vii și nu determină modificări vizibile asupra gazdei. Ex.: microorganismele tegumentare, care folosesc ca nutrienți substanțe rezultate din celulele descuamate ale pielii.

Simbioza – este o relație cu caracter benefic bidirecțional, notată pe baza efectului direct cu (++). Exemplul cel mai sugestiv este oferit de microbiota intestinului gros, care secretă substanțe importante pentru organismul-gazdă (dar nu esențiale), în timp ce acesta le oferă substanțe nutritive și protecție față de condițiile de mediu. Aceste microorganisme pot fi considerate în esență parazite, dar ale căror raporturi cu gazda au evoluat spre o toleranță mutuală completă și o infecție tolerată. Raporturile echilibrate care caracterizează starea de *eubioză* se pot deregla, evoluând spre starea de *disbioză*, ceea ce demonstrează că “simbionții nu sunt altruști”.

Oportunismul – este un tip de relație (+/-) cu o denumire antropomorfă, derivând din engl. *opportunity* ce înseamnă , « prilej favorabil », ceea ce sugerează că anumite specii bacteriene, alohtone sau autohtone, nepatogene în mod normal pot profita de condiția (temporară sau permanentă) în care se află gazda, determinând o infecție oportunistă; aceste specii bacteriene la rândul lor se numesc oportuniste sau condiționat-patogene. Relația de oportunism se manifestă în mai multe situații:

1) **Starea de purtător** - situație în care un organism normal este purtător al unor bacterii patogene (este cazul așa-zișilor purtători «sănătoși» de germeni, expresie considerată în prezent depășită). Starea de purtător poate fi precedată sau nu de o boală:

- dacă este precedată de o boală, aceasta este urmată de vindecare clinică, dar nu și de o sterilizare a focarului de infecție (respectiv de vindecare bacteriologică);
- dacă această stare nu a fost precedată de boală, poate fi consecința unei infecții inaparente (infecție asimptomatică, nemanifestă).

Astfel de situații se întâlnesc, de exemplu, când bacteriile contaminate regiuni avasculare unde celulele și moleculele sistemului imunitar nu au acces; exemplul cel mai banal este cel al indivizilor care poartă în gât stafilococi, streptococi, meningococi, aceștia putându-se transmite cu ușurință de la un individ la altul, mai ales în mediile aglomerate, pe cale aerogenă, prin picăturile de salivă formate în cursul actelor de vorbit, tuse, strănut. De pildă, streptococii aflați în cripte

amigdalieni pot determina periodic roșeață, durere și febră sau așa-numita angină streptococică, mai ales în sezonul friguros. Un alt exemplu este cel al speciilor de *Salmonella* (bacterii strict patogene); celulele bacteriene pot persista în organism (în ganglionii limfatici intestinali) într-o stare de latență timp de 10 - 20 de ani, apoi să determine o recădere, o reapariție a bolii în absența unei noi infecții de la exterior.

2) **Organismul gazdă se află temporar într-o stare de anormalitate**, de exemplu după răniri grave, mari intervenții chirurgicale, leziuni severe ale tegumentelor și mucoaselor (arsuri), ca și după tratamente prelungite cu antibiotice de spectru larg administrate pe cale orală ; în acest ultim caz, antibioticele distrug bacteriile sensibile și creează o stare de disbioză, datorită anulării antagonismului existent în mod normal între diferitele specii de microorganisme din microbiota normală care se găsesc în mod normal în stare de *eubioză*, de echilibru interspecific. Adesea, astfel de infecții oportuniste sunt produse de levuri (de ex. *Candida sp.*), care se multiplică necontrolat (disbioză), fiind insensibile la antibiotice antibacteriene.

3) **Organismul gazdă se află într-o stare de anormalitate reprezentată de deficitul imunitar**, prezent în următoarele situații:

- a) – boli genetice și deficit imunitar înnașcut care afectează imunitatea mediată celular, imunitatea mediată umoral sau ambele tipuri de răspuns imun;
- b) – după administrarea de medicamente imunosupresoare (utilizate, de exemplu, în tratamentul bolilor autoimune sau pentru prevenirea respingerii grefelor de țesuturi și organe) sau radioterapie, care are ca efect secundar distrugerea unui mare număr de limfocite;
- c) – în malnutriție, stres prelungit;
- d) – deficit imunitar dobândit prin boală (boli neoplazice, boli infecțioase acute și cronice, bacteriene, parazitare, virale etc.), prototip al acestui fel de deficit imunitar fiind boala *SIDA* (fr.) = *AIDS* (engl.) = *sindromul de imunodeficiență dobândită* ca urmare a infectării organismului cu virusul HIV (*human immunodeficiency virus*). Prăbușirea sistemului imunitar este determinată de faptul că virusul are tropism și infectează limfocitele CD4+ = Th (helper), considerate pe bună dreptate "dirijorul orchestrei imunologice", datorită rolului lor deosebit de important în stimularea proliferării și diferențierii celorlalte subpopulații de limfocite, în desfășurarea răspunsului imun specific umoral sau celular, în toată amploarea sa. Recent s-a demonstrat că virusul poate infecta și macrofagele, ca și celulele nervoase din sistemul nervos central (prin fuziune cu macrofagele infectate), ceea ce explică complicațiile neurologice ale acestei boli.

Consecința relațiilor oportuniste este demonstrată tot de boala *SIDA*, care nu are semne caracteristice, patognomonice (ca scarlatina, difteria, pojarul etc). În general, infecțiile oportuniste nu produc boli cu manifestări caracteristice, ci *sindroame*, cu manifestări diferite, decurgând din natura agentului infecțios oportunist și natura țesutului afectat (infecții intestinale, respiratorii, cutaneo-mucoase); de exemplu, când numărul total de leucocite scade sub 400/mm³, bolnavii prezintă afte, infecții cu *Candida albicans*, micoze severe la nivelul membrilor inferioare

(“picioar de atlet”), *zona zoster* etc. Apariția acestor infecții corespunde stadiului bolii cunoscut ca stare pre-SIDA sau ARC (*AIDS related complex*). Când numărul leucocitelor scade la 200/mm³, se produc infecții severe bacteriene (cu *Mycobacterium tuberculosis* și micobacterii paratuberculoase), fungice (*Cryptococcus neoformans*), parazitare (*Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* sp, *Pneumocystis carinii* – această ultimă specie fiind încadrată în prezent între microfungi) și virale (*Herpes simplex I* și *II*, *Herpes zoster*, *Cytomegalovirus*). Când numărul de leucocite scade la ~100/mm³, crește și frecvența apariției tumorilor (de ex., sarcomul Kaposi, limfoame).

Speciile oportuniste nu sunt identice cu microorganismele saprotrofe (cum ar fi *Clostridium butulinum*) care trăiesc pe materiile organice în descompunere și nu pot competiționa cu microbiota organismului normal, dar oportuniști se pot găsi printre saprotrofi (de ex. *Nocardia* sp.). Oportuniștii nu sunt identici nici cu speciile ce alcătuiesc microbiota normală, chiar dacă unii dintre membrii acesteia sunt capabili să producă infecții oportuniste.

Pentru precizarea conceptului de microorganism oportunist, s-au stabilit următoarele condiții:

- 1) Microorganismul trebuie să fie izolat de mai multe ori, din leziunile semnificative clinic, la gazde compromise din punct de vedere imunologic;
- 2) Microorganismul trebuie să fie semnificativ mai frecvent prezent și izolat în circumstanțele respective decât în restul populației;
- 3) Asocierea nu trebuie să fie determinată de o circumstanță care afectează atât sensibilitatea gazdei, cât și pe cea a microorganismului;
- 4) Asocierea nu trebuie să fie indirectă, conjuncturală; de exemplu, s-a demonstrat că salmonelozele sunt mai frecvente și mai severe la gastrectomizați, decât la indivizii martori de aceeași vârstă și același sex; relația nu este specifică celor două stări (gastrectomie și infecție), ci este determinată de hipoclorhidria consecutivă intervenției chirurgicale, care scade efectul bactericid al sucului gastric.

Lista bacteriilor implicate în infecții oportuniste este foarte lungă și incompletă, de multe ori fiind ignorate și considerate contaminanți întâmplători, astfel că nu apar pe buletinele de analiză.

Dintre acestea pot fi enumerate:

- *Escherichia coli*;
- *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*;
- *Edwardsiella*;
- *Erwinia herbicola*;
- *Klebsiella pneumoniae*;
- *Proteus mirabilis*;
- *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*;
- *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*;
- *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum*;
- *Moraxella catharralis*, *M. lacunata*;

- *Mycoplasma pneumoniae*;
- *Neisseria meningitidis*;
- *Nocardia* sp.;
- *Dermatophilus congolensis*;
- *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia* (den. actuală: *Burkholderia cepacia*);
- *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*;
- *Streptococcus pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. agalactiae*;
- *Acinetobacter calcoaceticus* (denumire veche *Herellea*); *A. baumannii*;
- *Alcaligenes* sp.;
- *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*;
- *Bacteroides fragilis*;
- *Clostridium perfringens*, *C. septicum*, *C. difficile*, *C. tertium*;
- *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *C. hoffmani*, *C. xerosis* etc.

Parazitismul - corespunde relației în care un organism se hrănește cu celulele, țesuturile sau lichidele corpului altui organism viu, care poate suferi prejudicii, mai mult sau mai puțin severe. Relația parazit-gazdă este, în general, de relativ lungă durată deoarece, așa cum susținea Burnet (distins cu premiul Nobel pentru Fiziologie și Medicină în 1960), paraziții cei mai bine adaptați sunt cei care nu își distrug gazda, deoarece aceasta ar însemna și dispariția lor.

Parazitismul celor aprox. 550 de bacterii cunoscute ca patogene pentru om și animale se poate manifesta în grade diferite:

- **extracelular** – ex.: *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria* sp., *Mycoplasma* sp. etc.;
- **facultativ intracelular** – ex.: *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella* sp.
- **obligat intracelular** – caracterizează bacteriile încadrate în familiile: *Rickettsiaceae*, *Chlamydiaceae*, *Bartonellaceae*; aceste bacterii nu pot fi cultivate pe medii bacteriologice, ci numai pe un substrat celular viu.

În unele cazuri relația parazit-gazdă se manifestă cu mare specificitate, cum este cazul speciilor bacteriene *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, care infectează natural numai specia umană. Specificitatea este condiționată de faza inițială de recunoaștere și aderare a microorganismelor patogene la nivelul unor receptori specifici de pe membrana celulelor-gazdă sensibile.

Bacteriile parazite intracelular au dezvoltat în cursul evoluției proprietăți care le permit să se dezvolte în acest mediu; unele sunt capabile să supraviețuiască chiar în interiorul macrofagelor, un mediu cunoscut ca impropriu, prin mecanisme care se opun procesului de digestie intracelulară; de exemplu bacteriile aparținând speciei *Mycobacterium tuberculosis*, au un perete celular cu o structură particulară, cu un conținut bogat în lipide - ceruri (acizi micolici esterificați cu trehaloză), componente care le protejează de activitatea enzimelor lizozomale.

Dacă microorganismele parazite sunt și patogene, corelația inversă nu este obligatorie, astfel că există și bacterii saprotrofe (ex. *Clostridium botulinum*), incapabile să se multiplice în organism, dar care pot fi patogene, datorită exotoxinelor produse și eliberate în mediu, eventual

ingerate de către gazdă.

Microorganismele patogene și proprietățile lor definitorii. Microorganismele patogene au două proprietăți care le definesc: 1) *patogenitatea* și 2) *virulența*.

1) **Patogenitatea** este o proprietate esențială a oricărui agent infecțios și se referă la capacitatea acestuia de a determina apariția unui proces infecțios (persistența +/- multiplicarea în organismul gazdei), de obicei decelabil din punct de vedere clinic prin starea de boală, atunci când pătrunde în mod natural sau când este introdus experimental în organismul unei gazde sensibile.

Procesul infecțios sau infecția (lat. *inficere* = a otrăvi, a deteriora) este determinată de capacitatea agentului patogen de a se localiza și multiplica în organism, asigurând stabilirea în gazdă prin colonizarea tranzitorie sau de durată, ca și transmiterea la o nouă gazdă sensibilă. Infecția poate fi inaparentă sau manifestă (simptomatică), în acest caz având o evoluție asociată cu perturbarea stării normale de sănătate a organismului-gazdă și cu fenomene de disconfort, boala infecțioasă având de multe ori un tablou clinic caracteristic.

Patogenitatea este o proprietate de specie, care a apărut în cursul coevoluției agenților patogeni cu organismele-gazdă și constă în însușirea potențială a unui agent infecțios de a infecta și de a produce îmbolnăvirea organismelor receptive, sensibile. Ca urmare, unele bacterii sunt patogene, cu grade de virulență diferite de la o tulpină la alta (*Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium tetani*, *Salmonella sp.*), în timp ce altele sunt întotdeauna nepatogene datorită incapacității lor de a se stabili și de a se multiplica într-un organism animal (*Azotobacter sp.*, *Nitrobacter sp.*, *Rhizobium sp. etc.*). Între aceste extreme se află speciile condiționat patogene, ce-și manifestă potențialul patogen doar în anumite condiții.

Patogenitatea se caracterizează prin patru proprietăți esențiale:

- 1) capacitatea de a pătrunde și a se localiza în organismul-gazdei;
- 2) multiplicarea în țesuturile gazdei (+/- producere de toxine) și/sau invadarea acestora;
- 3) capacitatea de a stimula un răspuns imun și de a rezista mecanismelor de apărare ale gazdei;
- 4) producerea de leziuni, manifestate prin simptome de boală.

Adaptarea unui microorganism patogen la diferite gazde (om, animale sau plante) nu implică un grad foarte înalt de patogenitate, tocmai pentru că tulpinile patogene care determină o mortalitate mare printre organismele infectate, supraviețuiesc mai greu în natură, prin urmare și diseminarea lor va fi limitată sau poate înceta complet. În consecință, agenții patogeni cel mai bine adaptați pentru a supraviețui sunt cei care provoacă infecții ușoare, cu un număr mare de îmbolnăviri subclinice și cei care determină o imunitate slabă, de scurtă durată.

2) **Virulența** reprezintă capacitatea unei tulpini date a unui microorganism patogen, aflată într-o anumită fază de creștere, de a se localiza, de a coloniza, de a se multiplica și, eventual, de a invada celulele și țesuturile organismului-gazdă și de a produce toxine, determinând o stare patologică la o anumită gazdă, atunci când este introdusă în organismul acesteia în condiții bine definite. Această definiție constituie o viziune ecologică a relației obligatorii dintre parazit și gazdă în determinarea bolii, ca și a gradului său de gravitate, dependent de particularitățile celor doi parteneri la momentul stabilirii relației.

Virulența este o proprietate multifactorială, care exprimă cantitativ gradul de patogenitate al unei tulpini pentru o anumită gazdă și este determinată de însumarea unor însușiri diferite și independente, cum sunt capacitatea de infecțiozitate, de invazie și de toxigenitate. Datorită acestor însușiri, agentul patogen poate să reziste mecanismelor de apărare ale gazdei, nespecifice - care încep să acționeze imediat după pătrunderea acestuia în organism și apoi celor specifice, care acționează după o perioadă de latență, dar sunt mai eficiente. Dacă agentul patogen este capabil să reziste și să se adapteze, să se multiplice, va determina starea de boală, cu simptome +/- intense, în funcție de gradul de virulență a tulpinii agentului infecțios respectiv.

Virulența este o proprietate de tulpină, ce variază de la o tulpină la alta în cadrul aceleiași specii, dar și la aceeași tulpină în timp, deoarece se pot câștiga sau pierde gene de virulență, prin mutații sau retromutații, ca și prin câștig sau pierdere de plasmide. Mai mult, virulența poate fi influențată și de diferitele proprietăți ale organismului-gazdă, ale terenului față de care se manifestă virulența.

Virulența poate fi cuantificată experimental; inițial, se aprecia în funcție de cantitățile minime de bacterii sau de toxină capabile să producă moartea animalelor la care erau administrate și se exprima prin **doza minimă letală = DML**, care reprezintă cantitatea minimă de bacterii (sau de toxină) care produce infecția (respectiv intoxicația) și moartea tuturor animalelor receptive, raportată la o anumită specie animală, cu o greutate standard și la o anumită perioadă de timp. Pentru a evita erorile legate de variațiile individuale ale organismelor-gazdă, determinările se fac în prezent pe loturi mari de animale (de regulă 10) și se exprimă prin **DL50 = doza letală 50**, care reprezintă cantitatea minimă de microorganisme (sau de toxină) care determină moartea a 50% dintre animalele inoculate.

Virulența este determinată de mai mulți factori de virulență: infecțiozitatea, agresivitatea, capacitatea de aderență la un substrat celular sensibil, toxinogenexa.

Factori de virulență

Infecțiozitatea constă în capacitatea agenților patogeni de a stabili un focar infecțios

primar, ocupând un anumit teritoriu în organismul-gazdă.

Agresivitatea sau **invazivitatea** rezidă în capacitatea microorganismelor patogene de a se localiza, de a se multiplica și coloniza organismul gazdei, eventual de a difuza sau invada organismul gazdă pe diferite căi (cale vasculară, nervoasă, prin țesutul conjunctiv). Agresivitatea nu este o proprietate obligatorie la bacteriile patogene, deoarece există bacterii neagresive care determină îmbolnăviri grave, cu efect letal. Unele pot provoca un focar infecțios local, rămânând cantonate la acel nivel, așa cum este cazul bacteriei *Corynebacterium diphtheriae*, agentul patogen al difteriei, care se localizează la nivelul orofaringelui și elimină o toxină foarte puternică, ce ajunge în fluxul sanguin și difuzează în tot organismul. Specia *Streptococcus pneumoniae* nu produce toxine, dar are o mare capacitate de invazie în țesutul pulmonar datorită multiplicării intense, urmate de modificări structurale și funcționale ale acestuia ce pot conduce la *exitus*.

Agresivitatea este determinată de capacitatea agentului patogen de a sintetiza și elibera o serie de factori de difuziune denumiți generic *agresine*, care sunt lipsite de toxicitate, dar creează condiții ce asigură răspândirea bacteriilor, favorizând în același timp și multiplicarea lor. Bacteriile foarte agresive determină infecții grave, mortale; un exemplu în acest sens poate fi bacteria *Bacillus anthracis*, agentul patogen al antraxului, care are un efect letal prin capacitatea mare de multiplicare și formarea de trombusuri ce astupă capilarele, determinând fenomene de hipoxie, ischemie și necroză tisulară, dar și prin producerea de toxine.

Agresinele favorizează colonizarea gazdei de către agentul patogen, reprezentând o etapă, *sine qua non*, a oricărui proces infecțios, prin următoarele mecanisme: facilitează difuzia agentului patogen în țesuturile gazdei, interferează cu mecanismele de apărare ale gazdei, reducându-le eficiența, potențează infecțiozitatea agenților patogeni. Exemple :

Factori de difuziune și invazie - o serie de enzime bacteriene cu acțiune asupra unor celule/molecule ale gazdei, care facilitează diseminarea sau invazia agentului patogen în organism, prin alterarea integrității tisulare, prin citoliza locală sau la distanță a unor celule sensibile (leucocite, hematii), prin activarea mecanismelor fibrinolitice, cum ar fi:

- *hialuronidaza* – depolimerizează hialuronatul din țesutul conjunctiv, pe care îl fluidifică, facilitând diseminarea agentului patogen în organism (ex.: *Str. pyogenes*);
- *colagenaza* – enzimă degradativă a colagenului, produsă de *Clostridium perfringens*, *C. histolyticum*, cu efect de dezintegrare a țesutului muscular;
- *exfoliatine* – enzime ce degradează proteinele intercelulare, acțiunea lor având un efect de anulare a barierei tegumentare în calea agenților infecțioși (ex.: anumite tulpini de *S. aureus*, agenți etiologici ai sindromului de șoc toxic = TSS);
- *lecitinaza* (fosfolipaza C) produsă de *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *Pseudomonas sp.* – scindează lecitina (component al membranei celulare) în fosforilcolină și diglicerid, având un efect citolitic (asupra diferitelor țesuturi, hematiilor, leucocitelor) și de rupere a membranei organelor celulare (mitochondrii, reticul endoplasmic);
- *fibrinolizinele* (streptokinaza, stafilokinaza) produc liza cheagului sanguin care se formează ca reacție de apărare locală, favorizând diseminarea bacteriilor din rețeaua de fibrină;

- *toxine enzime* cu acțiune selectivă asupra anumitor celule ale gazdei: hemolizine și leucocidine;
- *enzime* cu acțiune degradativă asupra moleculelor de ADN: streptodornaza, DN-aza stafilococică.

Agresine care interferează cu factorii celulari și umorali bactericizi nespecfici ai gazdei (fagocitele, sistemul complement). Aceste efecte sunt atribuite polizaharidelor capsulare și unor componente ale peretelui celular; exemple:

- unele bacterii sintetizează molecule cu efect chimiotactic negativ asupra fagocitelor (*S. aureus*, *M. tuberculosis*);
- materialul capsular electronegativ din structura celulelor de *Str. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis* inhibă aderența acestor bacterii la membrana fagocitelor (PMN, macrofage), datorită forțelor electrostatice de respingere, care se manifestă în cazul bacteriilor neopsonizate de către complement și anticorpi (C3b, IgG), deci la începutul unei infecții; materialul polimeric capsular care conține acid sialic nu are efect activator al căii alternative a SC
- *Str. pyogenes* – produce o enzimă care degradează C5a – un chemoatractant puternic;
- *Brucella sp.* produce leucopenie marcată, prin efect direct asupra măduvei hematogene;
- anumite specii și tulpini bacteriene sintetizează factori numiți *defensine*, cu ajutorul cărora inactivează factorii microbicizi ai gazdei:
 - catalaza, superoxiddismutaza - din fagocite;
- proteinele sistemului complement ce determină așa-numitul efect bactericid al serului, la care bacteriile Gram pozitive sunt natural rezistente, sensibile fiind cele Gram negative, în general; fac excepție anumite specii patogene și tulpini virulente care nu permit activarea SC și formarea complexului de atac al membranei, împiedicând liza acestuia mediata de complement, deși Ac specifici se leagă de epitopii bacterieni; ex.:
 - o *N. meningitidis*, *E. coli K1* (tulpină patogenă, capsulată - agent etiologic al meningitei neonatorum), rezistă la acțiunea serului datorită modificării structurii LPS prin cuplarea covalentă a acidului sialic;
 - o *Haemophilus influenzae* tip b, rezistă la acțiunea serului prin modificarea structurii LPS.
- resturile de manoză prezente pe suprafața bacteriilor (dar nu și pe celulele umane), determină macrofagele care fagocitează bacterii să sintetizeze IL-6; această citokină stimulează ficatul să producă o proteină care se leagă specific de manoză de pe suprafața bacteriilor, determinând schimbări conformaționale și activarea consecutivă a SC; în infecțiile acute are loc o creștere intensă a sintezei de IL-6 și a proteinelor care leagă manoză (PLM), cu efect protector față de bacteriile care nu activează repede SC.

Factori care interferează cu răspunsul imun – microorganismele patogene pot supraviețui în organismul-gazdă prin mecanisme care reduc eficiența răspunsului imun sau îl anulează; de ex.:

- antigenele heterofile, mai exact asemănarea chimică a anumitor componente bacteriene (Ag) cu componente ale gazdei, cum ar fi: proteina M a streptococilor care este asemănătoare din punct de vedere chimic cu constituenți ai fibrei miocardice; LPS din structura peretelui celular al bacteriilor Gram negative, care se aseamănă chimic cu antigenele de histocompatibilitate; capsula bacteriei *Str. pyogenes* conține acid hialuronic, care intră și în compoziția țesutului conjunctiv; astfel, aceste substanțe bacteriene sunt mai slab antigenice, agenții infecțioși respectivi vor fi tolerați, iar Ac specifici vor reacționa încrucișat cu componentele similare ale gazdei, determinând complicații imunologice de tip autoimun în cazul infecțiilor cronice;
- determinanții antigenici bacterieni pot fi mascați de molecule ale gazdei, cu rol protector; ex:
 - coagulaza stafilococică determină coagularea plasmei și asigură izolarea celulelor

bacteriene (*S. aureus*) într-un strat de fibrină, protector față de efectorii imunitari ai gazdei;

- *Treponema pallidum* - prezintă un înveliș numit teaca externă (constituită din polizaharide, proteine, lipide) care adsoarbe proteine serice și protejează astfel bacteriile împotriva efecturilor imunitari ai gazdei;
- bacteriile pot sintetiza componente chimice care diminuează intensitatea răspunsului imun:
- celulele de *Klebsiella pneumoniae* eliberează antigene solubile de suprafață (polizaharide capsulare) care reacționează cu anticorpii liberi, ce nu se mai pot lega de celulele bacteriene, reducând astfel eficiența răspunsului imun specific;
- proteina A stafilococică și proteina G streptococică din structura P.C. al acestor bacterii leagă moleculele de Ig, cu efect de învelire a celulelor bacteriene în Ac, dar într-o manieră diferită, astfel că inhibă opsonizarea și fagocitoza opsonică;
- bacteriile patogene care colonizează mucoasele, au în general proprietatea de a elabora enzime extracelulare, cu ajutorul cărora contracarează efectul protector al anticorpilor sIgA prezenți în secreții; aceste enzime (sintetizate de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *N. gonorrhoeae*) sunt din categoria proteazelor și clivează moleculele subclasei IgA₁, în fragmentele Fab și Fc; moleculele subcls. IgA₂ sunt rezistente la proteoliză, deoarece le lipsește o secvență de 16 aminoacizi situată lângă regiunea balamă, care conferă sensibilitate la proteoliza enzimatică; în replică, organismul gazdă produce anticorpi anti-IgA proteaze (din clasele IgA și IgG); cu excepția bacteriei *N. gonorrhoeae*, sinteza IgA proteazelor este asociată la bacteriile respective cu prezența capsulei, care are efect antifagocitar;
- proteinele membranei externe din structura peretelui celular al bacteriilor Gram negative nu au doar rol structural, ci îndeplinesc și alte funcții (aceeași proteină poate avea mai multe funcții); rolul lor în virulență se realizează în principal pe trei căi :
 - 1) **participarea la procesul de incorporare a fierului** ;
 - 2) mediatori de aderență la celulele sensibile;
 - 3) mediatori de invazie, numiți *invazine* – care determină endocitarea bacteriilor de către celula gazdă (cu participarea filamentelor de actină, suportul mecanic al vâlrilor menâmbanare); invazia constituie un mecanism principal de virulență la speciile patogene *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, bacterii care după invazie se multiplica masiv intracelular și lizează celula-gazdă); la bacteriile condiționat – patogene, invazia este un factor secundar de virulență (tulpini patogene de *E. coli*, *Citrobacter sp.* etc.), se realizează cu participarea filamentelor de tubulină ; invazia nu este urmată de multiplicarea bacteriilor, fiind doar un mijloc de persistență al acestor bacterii, ce determină infecții cronice, recidivante
- peptidoglicanul (mureina), constituentul major al peretelui celular la bacteriile Gram pozitive (80 – 90 % din greutatea uscată a peretelui), prezent în cantitate mult mai mică la cele Gram negative (8– 10 % din greutatea uscată a peretelui), are nu numai rol structural, ci este implicat și în patologie; s-a demonstrat ca fragmente mici de perete celular (g.m. $5,3 \times 10^6$ Da) determină artrite acute, în timp ce fragmentele mari determină artrite cronice cu debut tardiv ; pe lângă acest *efect artritogen*, s-au demonstrat și alte efecte ale peptidoglicanului: pirogen, somnogen, mitogen, de inducere a sintezei de interleukina –1, interferoni și prostaglandine, de stimulare a fagocitozei (efect inflamator);
- lipoproteinele și acizii teichoici sunt componente antigenice care activează sistemul complement, au efect mitogen, imunogen, de activare a funcției macrofagelor (efect inflamator).

Rolul cationilor Fe^{3+} în virulență

Multiplicarea eficientă a bacteriilor patogene în țesuturile organismului gazdă este condiționată de prezența obligatorie a fierului feric, într-o formă accesibilă metabolismului lor, fierul fiind necesar pentru anumite reacții enzimatice esențiale pentru creștere, ca și un component cheie al catenei de transport al electronilor în membrana celulară (de respirație celulară); fierul

intră și în compoziția superoxidismutazelor (SOD) la bacteriile Gram negative aerobe și aerobe facultativ anaerobe. SOD sunt enzime necesare în respirația aerobă pentru inactivarea ionului superoxid, intermediar al reducerii oxigenului, înalt reactiv și potențial nociv, dar și un mecanism de protecție față de sistemele microbicide dependente de oxigen și mieloperoxidază ale fagocitelor. Deși fierul este prezent în mediul natural, ca și în organismul mamiferelor, în concentrații suficiente pentru a asigura creșterea nelimitată a microorganismelor, se găsește în formă inaccesibilă; un deficit minor are efecte bacteriostatice, în timp ce un deficit major are efecte bactericide (fiind inhibată proteosinteza).

Producerea multor metaboliți extracelulari, inclusiv toxine, este parțial reglată de concentrația ionilor de Fe în mediul înconjurător. De exemplu, expresia genei structurale a fagului β pentru toxina difterică din tulpinile lizogene de *Corynebacterium diphtheriae*, este dependentă de nivelul de Fe în mediu.

Mecanismele insolubilizării fierului în organismul animal. Fierul anorganic este insolubil în aerobioză și la un pH în limite fiziologice. În mediul natural fierul este legat de agenți chelatori sau complexoni (cu structură ciclică), pe când în organismul mamiferelor este legat în complexe organice cu proteine chelatoare, astfel ca bacteriile invadatoare trebuie să competiționeze pentru fier cu unii constituenți celulari ca: feritina, hemosiderina, gruparea hem și unele glicoproteine extracelulare, precum și cu transferina (TF) din sânge și limfă, lactoferina din PMN. Aceste substanțe au afinitate pentru fier și sunt parțial saturate (TF este saturată în proporție de 30% din capacitatea sa de legare) și determină reducerea concentrației fierului liber în organism la valori foarte mici – la concentrația de $6 \times 10^{-9} \mu\text{M}$ serul sanguin fiind bacteriostatic. În infecțiile sistemice are loc o creștere intensă a transferinei din sânge, LF eliberată din PMN se leagă de receptorii M-fagelor sechestrând fierul, ceea ce determină o reducere a disponibilității fierului pentru creșterea bacteriilor (hiposideremie).

Mecanisme de obținere a Fe pentru creștere. S-a demonstrat că *E. coli* sintetizează mai multe sisteme biochimice care asigură translocarea fierului feric în celule, apoi acesta este convertit în Fe feros (utilizat în celula bacteriană). Un mecanism majoritar îl constituie sinteza și secreția unor agenți chelatori numiți *siderofori*, cu mare afinitate pentru fierul feric; sinteza acestora este indusă de scăderea concentrației fierului sub un prag critic ($10 \mu\text{M}$).

Un microorganism poate sintetiza 1 - 2 siderofori, care sunt prezenți la speciile patogene, cât și la cele comensale și saprotrofe. De exemplu, *E. coli* și alte enterobacterii care sunt componente ale microbiotei normale intestinale (*Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*) produc siderofori denumiți generic *enterocheline* (-bactine). La *E. coli* constituie un factor esențial de virulență, prezent la tulpinile enteropatogene și enteroinvazive, ca și la cele izolate din infecțiile extraintestinale (septicemii, meningita neonatală, infecții urinare = pielonefrite la om și animale). Dar siderofori au fost identificați și la enterobacterii patogene, cum ar fi: *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.* Sideroforii pot fi denumiți și după specia producătoare; de ex: *Aerobacter aerogenes* sintetizează *aerobactina*; specii ale genului *Neisseria* - gonococii produc *gonobactine*; meningococii produc *meningobactine*; speciile genului *Pseudomonas* produc *piocheline*.

Sideroforii pot fi și secretați în mediu, iar complexele Fe-siderofori formate sunt internalizate și apoi extras fierul. Alte bacterii, mai puțin virulente, nu produc siderofori, dar pot internaliza aceste complexe și capta Fe (au receptori pentru siderofori-Fe, similari cu cei pentru bacteriofagi, toxine), ceea ce constituie o dovadă a importanței fierului în biologia bacteriilor.

Aderența unui număr relativ mic de microorganisme patogene la celulele sensibile ale gazdei, urmată de creșterea și multiplicarea în organismul gazdei, rezistând mecanismelor de apărare antiinfecțioasă ale gazdei, conduc la stabilirea unui focar infecțios și apoi la colonizarea situsului (ex. mucoasa respiratorie, intestinală, urinară, genitală) sau a întregului organism (invazie). Cu cât este mai virulent (infecțios, aderent, agresiv, +/- toxigen), cu atât un patogen rezistă mai bine la mecanismele de apărare ale gazdei, pe care o colonizează. Rezistența sa în gazdă este influențată și de capacitatea unor structuri de suprafață ale patogenilor din categoria adezinelor, de a suferi fenomenul variației antigenice, care determină ineficiența răspunsului imun specific al gazdei față de noile variante antigenice apărute ca efect al presiunii imunologice a gazdei.

Capacitatea de aderență a bacteriilor la substrat

Notiunea de **aderență** în biologie constituie un concept de o importanță fundamentală, mecanismele de fixare fiind o etapă prealabilă necesară majorității proceselor biologice, atât fiziologice cât și patologice. Organizarea arhitecturală complexă ca și potențialul funcțional major al învelișurilor celulare, care interferează cu toate procesele biologice care se desfășoară la nivel celular, au determinat ca structurile de graniță să devină de multă vreme un subiect privilegiat al biologiei celulare și moleculare, inclusiv al imunologiei.

După lucrările de pionierat de la începutul secolului al XX-lea asupra adeziunii microbiene, referitoare la mediul marin unde suprafețele constituie adesea singurele situsuri în care concentrațiile de nutrienți sunt adecvate creșterii microbiene, s-a conturat apoi ideea că adeziunea este și un important factor determinant al colonizării unor situsuri specifice la plante și animale și în special, **o etapă timpurie crucială în procesul infecțios**, fiind o precondiție a colonizării organismelor parazitare. Justificat de importanța medicală a fenomenului în patogenizarea bolilor infecțioase, aderența a fost mult studiată la bacteriile patogene, la care este considerată un factor de virulență (după unii autori un factor aparte, după alții, unul dintre factorii de agresivitate). Mai mult, infecțiile în care agenții cauzali cresc în biofilme sunt profund diferite de infecțiile cauzate de bacterii libere, datorită etologiei lor, timpului de generație diferit, sensibilității diferite la agenți antimicrobieni. Adeziunea bacteriană este implicată nu doar în interacțiunile dintre microorganisme și macroorganisme, ci și în cele dintre microorganisme și dintre acestea și substraturi inerte din punct de vedere nutrițional, cum sunt cele utilizate în medicină ca dispozitive protetice (diferite tipuri de sonde, catetere, proteze ș.a.).

Etapile procesului de aderență bacteriană. Zo Bell și Allen, ulterior Marshall și colab. (1971) au distins două faze în atașarea bacteriilor la suprafețe. Prima fază este reversibilă și constă într-o asociere slabă în care bacteriile sunt menținute în vecinătatea suprafeței prin forțe slabe London - van der Waals. A doua fază - ireversibilă, este dependentă de timp și implică sinteza de către bacterii a unor fibrile extracelulare polimerice pentru a lega cele două suprafețe și astfel, a învinge forța repulsiei electrostatice dintre cele două suprafețe încărcate electronegativ. Aderența implică apropierea strânsă dintre cele două tipuri de celule, care permite interacțiunea situsurilor complementare de pe suprafața lor. Deși cele mai multe bacterii sunt încărcate electronegativ, ele posedă regiuni limitate ale suprafeței, electropozitive, ca și molecule cu caracter hidrofob (hidrofobine). Prezența grupărilor cu sarcini opuse și a hidrofobinelor face posibilă totuși apropierea și interacțiunea foarte stabilă între două suprafețe foarte electronegative (fig. 2).

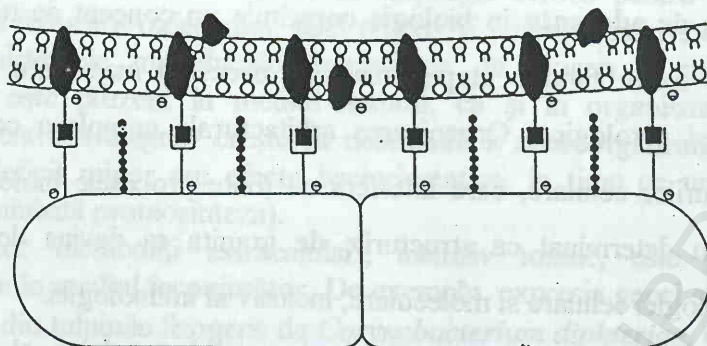


Fig. 2. Atasarea celulelor bacteriene prin intermediul adezinelor specifice (L) la receptori complementari (R) de pe membrana celulei-gazda. Invingerea repulsiei electrostatice dintre suprafețele celor două celule încărcate negativ este posibilă prin atragerea moleculelor hidrofobe (D) de pe suprafața bacteriilor, de către molecule hidrofobe ale fosfolipidelor membranare (Q).

Mecanismul de atasare corespunzător fazei reversibile este cunoscut ca o **aderență nespecifică** și este forma obișnuită de adeziune observată în cazul acelor microorganisme capabile să adere la diferite tipuri de suprafețe inerte (neanimate). Mecanismul **aderenței specifice** (care corespunde fazei ireversibile) a anumitor microorganisme la anumite suprafețe, implică și interacțiuni între molecule complementare de pe suprafața microorganismelor și suprafețele de atasare. Adeziunea bacteriilor la celulele animale se realizează prin acest mecanism. Bacteriile posedă pe suprafața lor molecule de legare numite *adezine* care sunt capabile să interacționeze stereospecific cu *receptorii* de pe membranele celulelor gazdă, într-o manieră analogă interacțiunilor antigen - anticorp sau lectine vegetale - glucide. Astfel, un proces inițial de reținere laxă este urmat de o ancorare permanentă, care necesită formarea de multe legături lacat-cheie între aceste molecule complementare. Când aceasta este realizată, atasarea este virtual ireversibilă în condiții fiziologice.

Etapa de legare ireversibilă sau permanentă se realizează la distanțe foarte mici de peretele celular și numai când interacțiunile de la distanță sunt dominate de forțele atractive (fig.3). Adeziunea este favorizată de prezența polizaharidelor extracelulare și a glicoproteinelor preformate sau sintetizate *de novo* pe suprafața celulelor care adere, ca și de prezența unor apendice filamentoase (fimbrii, pili, flageli) care interacționează cu receptorii complementari. Pentru sinteza *de novo* a adezinelor este necesară activitatea metabolică celulară, realizată cu consum de energie. Fenomenul explică de ce bacteriile în fază exponențială de creștere adere mai repede de substraturi decât celulele din fază staționară, bătrâne sau moarte.

Colonizarea suprafetelor. După legarea fermă, bacteriile încep să crească și să se înmulțească rapid. Celulele legate ireversibil de substrat, dar nu și între ele, formează un monostrat continuu care acoperă toată suprafața substratului, iar cele legate și de substrat și între ele formează *microcolonii* și *biofilme*. Ulterior, biofilmele devin pluristratificate și se adaugă uneori, cantități mari de polimeri specifici, cu structură reticulată sau fibrilară, care ancorează suplimentar biofilmul. Când acesta devine suficient de gros, straturile profunde devin anoxice și conțin preponderent specii anaerobe. Treptat, celulele bazale sunt infometate și pot să moară sau să se lizeze. Aceste fenomene -anoxia, moartea celulelor, la care se adaugă și producerea de gaze, pot destabiliza biofilmul, determinând detasarea unor agregate celulare de suprafețele solide și diseminarea lor la distanță. Creșterea poate fi reluată, având un caracter ciclic.

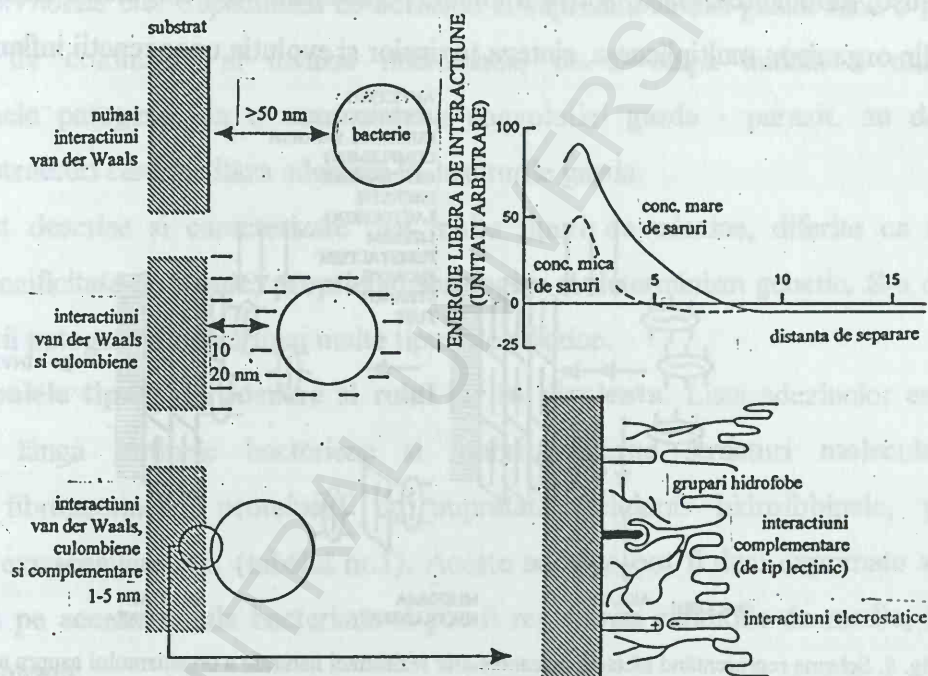


Fig. 3. Schema care ilustrează cele două suprafețe încărcate electric care interacționează în procesul de aderență bacteriană (substrat – celula bacteriană); interacțiunile sunt în funcție de distanța dintre cele două suprafețe, de concentrația de electroliti, ca și de prezența unor situsuri de legare complementare.

Cercetările au demonstrat că bacteriile aderente prezintă o creștere mai intensă și o viteză metabolică mai mare, comparativ cu cea a populațiilor aflate în suspensie. Gruparea microorganismelor în microcolonii aderente stimulează schimburile respiratorii, iar prin prezența exopolizaharidelor se asigură menținerea unui pH apropiat de cel optim, ca și protecția față de desicată și substanțe antimicrobiene.

Adezinele bacteriene ca factor de virulenta si implicatiile imunologice ale caracterului lor antigenic

Capacitatea agentilor patogeni de a adera la suprafata celulelor sensibile este mediata de structuri de pe suprafata lor, denumite generic *adezine*. Termenii de *adezina* si *receptor* sunt utilizati pentru a descrie componente care mediaza atasarea microorganismelor la celulele animale. Adezinele sunt structuri adezive de pe suprafata celulelor microbiene, in timp ce receptorii sunt structuri adezive complementare prezente pe suprafata celulelor gazda. Pe calea unor activitati de tip lectinic, adezinele asigura aderenta si colonizarea diferitelor mucoase: respiratorii, intestinale, urogenitale si chiar a unor suprafete solide ca dentina.

Capacitatea bacteriilor de a adera impiedica indepartarea lor prin mecanisme fizice si fiziologice care constituie prima linie de aparare a organismului, cum ar fi: fluxul diferitelor secretii, tuse, mobilitatea foarte activa a cililor, peristaltism etc., asigurând colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea, sinteza toxinelor si evolutia unor reactii inflamatorii (fig. 4).

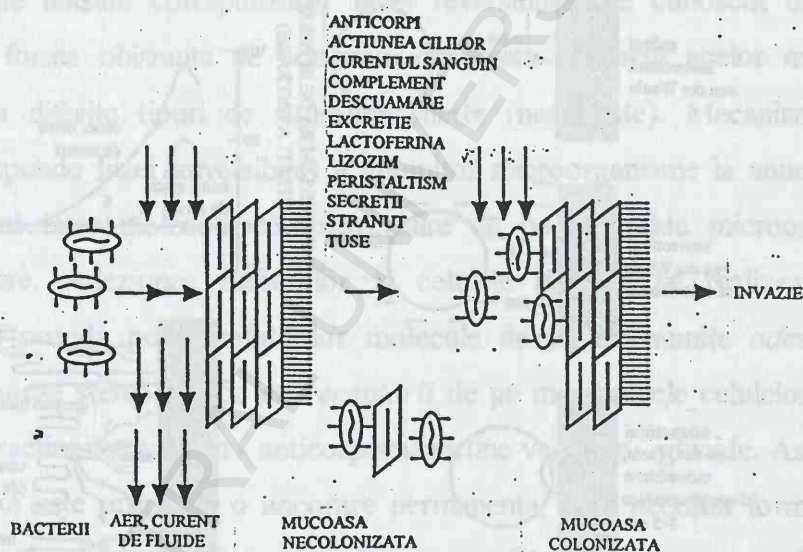


Fig. 4. Schema reprezentând efectele mecanismelor rezistentei naturale a organismului asupra aderenței bacteriilor la suprafețele mucoase, care constituie principala poartă de intrare a agenților patogeni în organism. Pentru a adera, a prolifera și a coloniza un anumit situs, agentul patogen trebuie să învingă numeroasele mecanisme de apărare active la nivelul suprafețelor (tegumente și mucoase).

Bacteriile adera în general de epitelile mucoaselor, dar și de celule epiteliale cheratinizate, endotelii, oase, dinți etc. În unele cazuri, acest fenomen se manifestă cu un grad important de selectivitate, în altele este total nespecific. Pe lângă rolul esențial în declanșarea procesului infecțios, aderenta reprezintă și un avantaj ecologic important pentru bacteriile patogene (posibilitatea de acces la nutrienți, temperatura favorabilă, protecție față de lizozim, fagocite, anticorpi etc.).

În ultimii ani a devenit evident că aderenta câtorva celule bacteriene și formarea consecutivă de microcolonii reprezintă o etapă esențială în evoluția anumitor infecții.

Evidențierea aderenței bacterie-bacterie (cu formarea de microcolonii de *E. coli* enteropatogene, *Vibrio cholerae* s.a.) a condus la speculația că bacteriile au și receptori asemănători cu cei ai gazdei, ceea ce constituie un avantaj pentru bacterii; de exemplu, se poate realiza o concentrație locală mare a unor enzime citolitice, care favorizează invadarea țesutului sensibil pe cale transcelulară sau printre celule, după ruperea joncțiunilor intercelulare.

Specificitatea interacțiunii bacterii-celule sensibile poate explica natura celulelor infectate și chiar manifestările bolii. Fenomenele de aderență au fost studiate la un număr important de bacterii patogene, cum ar fi: *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Vibrio cholerae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus* sp., *Neisseria gonorrhoeae* etc. Capacitatea de aderență la suprafața celulei gazda fiind o precondiție a proceselor de colonizare și invazie microbiană, ca și etapa inițială a unei infecții, microorganismele patogene, ca o consecință a coevoluției gazda - parazit, au dezvoltat o diversitate de structuri care mediază aderența la țesuturile gazda.

Au fost descrise și caracterizate mai multe tipuri de adevine, diferite ca arhitectura moleculară, specificitate de legare, proprietăți serologice și determinism genetic. S-a demonstrat că unele bacterii patogene au chiar mai multe tipuri de adevine.

Principalele tipuri de adevine și rolul lor în virulență. Lista adevinelor este mare și cuprinde, pe lângă lectinele bacteriene și fimbrii, diferite structuri moleculare (acizii lipoteichoici, fibronectinele, proteinele de suprafața celulară, hidrofobinele, polianionii, polizaharidele extracelulare etc. (tabelul nr.1). Aceste adevine pot fi deci exprimate singure sau pot fi multiple pe aceeași celulă bacteriană și pot fi reglate de condițiile de mediu, inclusiv de cele oferite de gazda.

1. Fimbriile sunt apendice filamentoase tubulare, neflagelare, rigide, dispuse de obicei pericelular, de dimensiuni mici (10-200 nm), cu diametrul de 7 nm, dar aflate în număr foarte mare – între 100-1000 / celulă. Sunt codificate de gene cromosomale (un *cluster* de gene *fim*, de 9,5 kb ADN cu secvențe structurale și reglatoare) și neimplicate în transferul de ADN viral, cromosomal sau plasmidial. Sunt alcătuite dintr-un număr variabil de subunități moleculare de fimbriilină, o proteină cu o greutate moleculară de 16.600 Da, asamblate după o simetrie helicală.

În cazul bacteriilor patogene, fimbriile pot influența virulența acestora pe mai multe căi:

1. Prezența lor favorizează implantarea bacteriilor în organism, prin fixarea acestora de celule și țesuturi, fixare necesară pentru colonizare și pentru a evita "spălarea" lor de către

lichidele corpului, sau indepartarea prin acte fiziologice ca stranutul si tusea in cazul bacteriilor care colonizează caile respiratorii superioare.

2. In unele cazuri aceasta proprietate se manifesta cu specificitate de tesut; de exemplu, celule de *Escherichia coli* izolate din infectii urinare adera numai de epiteliul urinar.
3. Unele antigene din fimbrii induc formarea de anticorpi anti-fimbrii, iar altele maresc virulenta bacteriilor conferindu-le rezistenta marcata la fagocitoza.

Rolul fimbriilor in adeziune si virulenta. Anumite tulpini de *E. coli* sunt capabile sa produca infectii severe intestinale si extraintestinale. Tulpinile patogene de *E. coli* sunt capabile sa produca diferiti factori de virulenta cum ar fi factori de aderenta (fimbrii, capsule), toxine, siderofori. Adezinele acestor tulpini se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate si specificitate de receptor.

Tabel nr. 1. Exemple de adezine si receptori care mediaza legarea unor bacterii patogene de suprafata mucoaselor.

Microorganismul	Adezina	Receptorul
<i>Escherichia coli</i>	Fimbrii tip - 1	D-manoza
	Fimbrii P	α -D-Galp-(1-4)- β -D Galp
	Fimbrii K 88	β -D-Gal sau Glc, Gal si Fuc (gangliozyd Gm ₁)
	Fimbrii K 99	Gal Nac β (1-4)Gal β (1-4)Glc
	Fimbrii CFA	(gangliozyd GM ₂) 2 Neu Ac
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fimbrii	Resturi de acid sialic
<i>Vibrio cholerae</i>	Fimbrii	Fucoza
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fimbrii	Gal β (1-3) Gal Nac β (1-4) Gal
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acidul lipoteichoic	Fibronectine
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Complexul acid lipoteichoic-proteina M (fibrile)	Fibronectine
	Proteina de legare a glucanului	Glucan
<i>Streptococcus salivarius</i>	Lectina suprafetei celulare	Galactoza
<i>Streptococcus sanguis</i>	Acidul lipoteichoic	Resturi de acid sialic

Fimbriile tip-1 se ataseaza la receptori care contin manoza (hemaglutinaea bacteriilor cu fimbrii manozo-sensibile este inhibata in prezenta D-manozei) si determina aderenta celulelor de

E. coli la mucus, la celulele tractului gastrointestinal, urinar si ale orofarinxului), jucând un rol in colonizarea si diseminarea bacteriilor in corpul omului si animalelor. Una din bacteriile cel mai mult studiate este *E. coli* uropatogena pentru om, la care au fost descrise mai multe tipuri de fimbrii diferite pe baza morfologiei, a situsului specific de legare etc. (tabel nr. 2). Pe de alta parte, au fost localizati si receptorii de pe celulele mamiferelor (in rinichiul uman si vezica urinara) cu ajutorul marcarii diferentiale (cu izotiocianat de fluoresceina si tetrametil de rodamina), ceea ce a permis explicarea mecanismului infectiilor urinare ascendente.

Fimbriile tip-1, prezente la cele mai multe *Enterobacteriaceae* studiate, se leaga de resturile de D-manoza din structura glicoproteinelor de pe suprafata celulelor eucariote. Daca initial se considera ca fimbriile sunt formate dintr-un numar mare de molecule identice de fimbrilina, proteine dispuse dupa o simetrie helicala, date recente arata ca la bacteriile patogene, pe lânga componenta majora *FimA*, exista si un procent mic de componente minore (*FimF*, *FimG*, *FimH*) de tip lectina. Componenta *FimH* este localizata la extremitatea libera a fimbriilor, ca si de-a lungul lor si contine situsul de legare al D-manozei de pe suprafata celulelor eucariote. In acest context, proteina majora - fimbrilina, ar avea un rol structural si de sustinere a adezinei (proteina minora) responsabile de specificitatea de legare de receptorii celulari. In timp ce proteina majora difera ca structura primara intre diferitele specii enterice, adezina minora este conservata la un numar important de specii ale familiei *Enterobacteriaceae*.

Fimbriile tip-1 permit adeziunea de tractul intestinal si de mucoasa intestinului gros. In general actiunea lor asupra epiteliului cailor urinare este contracarata de actiunea inhibitoare a unei glicoproteine cu manoză (proteina Tamm - Horsfall) produsa in rinichi si eliberata in urina, cu rolul de a proteja rinichiul de infectia cu *E. coli*, prin inhibarea legarii fimbriilor tip-1 de receptorul lor specific.

In functie de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip si manifestari clinice, tulpinile de *E. coli* care determina boli diareice pot fi diferite in sase patotipuri numite si *virotipuri* (termen derivat de la *virulenta*) (vezi Principalele grupe de bacterii patogene – Bacili Gram negativi - Fam. *Enterobacteriaceae*).

Fimbriile (pili) P sau Pap (Pyelonephritis associated pili), sunt cunoscute sub diferite denumiri, ca fimbrii Gal-Gal (Gal-gal "binding fimbriae"). Fimbriile P sunt structuri filamentoase asemanatoare cu firele de par (engl. *hair-like*) care faciliteaza legarea si

colonizarea mucoasei urinare de catre bacteria *E. coli*. Tulpinile de *E. coli* fimbriate reprezinta o parte din microbiota indigena a intestinului gros la copii si la adulti. In timp ce cresterea lor la acest nivel este asimptomatica, trecerea aceleiasi tulpini de *E. coli* in tractul urinar poate cauza inflamatie si simptome de infectie urinara. In intestinul normal, celulele de *E. coli* se pot lega de globolipide eliberate anterior si la celule intestinale libere, descumate. Astfel, celulele bacteriene pot exista in numar mare ca celule plutitoare, incapabile de a se lega la suprafata celulelor intestinale. Aceste celule plutitoare sunt in mod normal excretate in materiile fecale, insa atunci când, aceleasi bacterii trec in tractul urinar, o aderenta ferma poate initia raspunsul gazdei. Forma secretata a receptorului GSL se pare ca a aparut in evolutie pentru a proteja intestinul gros de efectele inflamatoare ale microbiotei indigene.

Tabel nr. 2. Adezinele fimbrilare prezente la tulpinile de *Escherichia coli*, asociate cu infectiile cailor urinare umane si cu meningita *neonatorum*.

Tipul de adezina	Caracteristicile situsului de legare	Tipul de celule de care se leaga:		Maladia
		Rinichi	Vezica urinara	
Fimbriile tip 1 (80% din totalul tulpinilor)	Oligomanozide din structura glicoproteinelor	Lumenul tubulilor proximali, peretii vasculari	Stratul muscular, peretii vasculari	Infectii urinare si intestinale
Fimbriile P	α -D-Gal p-(1-4) β -D Gal p din glicosfingolipide	Lumenul tubulilor distali si proximali, si al canalelor colectoare, endoteliu, glomeruli	Epiteliu, endotelii, stratul muscular	Pielonefrite, infectii urinare
Fimbriile S	Secventele NeuNAc α 2-3DG al B1-4D Glc NAc din glicoproteine	Lumenul tubulilor distali si proximali, si al canalelor colectoare, endoteliu, glomeruli	Epitelii, endotelii, tesutul muscular, tesutul conjunctiv	Meningite, infectii ale nou-nascutilor
Fimbriile tip 1C	Necunoscute	Lumenul tubulilor distali si al canalelor colectoare, endotelii	Endotelii	Pielonefrite
Adezina 075X	Hemaglutinant, leaga colagenul tip IV; legarea este inhibata de cloramfenicol	Membrane bazale	Tesutul conjunctiv; legare slaba de epiteliu	Infectii urinare

Gal Nac = N-acetil-D-galactozamina; Glc Nac = N-acetil-D-glucozamina.

E. coli este de departe cel mai comun agent cauzal al infectiilor tractului urinar, la pacientii la care nu exista conditii predispozante. Mai mult decât 80 % din toate tulpinile de *E. coli* exprima fimbrii P, care sunt recunoscute în prezent ca un factor determinant-cheie al virulentei tulpinilor uropatogene. Receptorii specifici pe care îi recunosc fimbriile P sunt glicolipide care conțin α -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- β -Gal, care sunt prezenti în tesutul renal și pot explica rata mare de infectivitate a acestui organ de către bacteriile P-fimbriate. A devenit evident faptul că pe lângă facilitarea începutului unei infecții bacteriene, fimbriile exprimate de diferite bacterii patogene pot modula supraviețuirea în organismul gazda prin modificarea interacțiunii bacteriilor cu diferite celule ale răspunsului inflamator, inclusiv cu fagocitele. Faptul că un număr mare de leucocite polimorfonucleare neutrofile sunt adesea găsite în urina pacienților cu infecții ale tractului urinar este o altă indicație a implicării active a neutrofilelor în apărarea gazdei la nivel local. Adezinele tip Pap G protejează însă celulele fimbriate de *E. coli* de activitatea bactericida a neutrofilelor.

De asemenea, multe studii epidemiologice arată că alimentația naturală a nou-născuților îi protejează de infecțiile intestinale. Efectul protector al laptei matern este atribuit sIgA, dar și unor factori de apărare nespecfici cum ar fi lactoferina, lizozimul, factorul *bifidus* și oligozaharidele. Efectul protector este considerat a fi și rezultatul conținutului în compuși care acționează ca analogi ai receptorilor de adezine bacteriene și enterotoxine. Laptele uman conține multe glicocomponente, dintre care unele sunt bogate în oligozaharide fucozilate, cum ar fi lactoferina și componentul secretor (CS) în stare liberă, care (pe lângă alte roluri) ar putea juca rolul de analogi de receptori. S-a demonstrat că oligozaharidele fucozilate inhibă adeziunea tulpinilor de *E. coli* enterotoxigene și enteropatogene.

Cele mai multe bacterii au două sau mai multe tipuri de fimbrii cu specificități de legare diferite. Prin aceasta crește numărul celulelor sensibile, cu receptori diferiți, cu care se pot asocia bacteriile. De multe ori, exprimarea adezinelor nu este simultană, ci succesivă, corelate cu diferite faze ale infecției. Astfel aderența apare importantă nu numai în inițierea unei infecții, ci în întreaga sa evoluție.

Un factor agravant al infecției, dar cu valoare adaptativă pentru bacterii este *capacitatea fimbriilor de a suferi variații de fază*. Acesta explică pe de o parte, heterogenitatea tulpinilor de *E. coli* din caile urinare și capacitatea lor de a adera la diferite niveluri ale cailor urinare, iar pe de altă parte capacitatea de a evita acțiunea anticorpilor, cu specificitate față de adezinele exprimate într-o fază anterioară. Acest fenomen al variației antigenice reprezintă un mecanism

prin care anumite specii de bacterii patogene sintetizeaza succesiv un numar mare de variante diferite ale moleculelor sau structurilor de suprafata, pentru a scapa de apararea imunitara a organismului gazda. El asigura totdeauna supravietuirea unei parti din populatia de microorganisme infectante, chiar in prezenta unui raspuns imun foarte activ, pornind de la care se reface o populatie de microorganisme cu o structura antigenica diferita.

Dintre bacterii exemplul tipic de variatie antigenica il constituie *Neisseria gonorrhoeae*, comparata datorita acestei particularitati, de catre B. Brett Finlay si S. Falkow, cu un "cameleon iscusit". Celulele de *N. gonorrhoeae* exprima in orice moment al existentei lor un tip caracteristic de fimbrii, datorita functionarii unei singure gene pentru fimbrilina. Proteina are o masa moleculara care variaza intre 18 – 24 kDa ; pili maturi mediaza aderenta la diferite tipuri de celule eucariote care influenteaza interactiunile cu epiteliile, endoteliile si fagocitele. Genomul bacteriei contine insa mai multe secvente incomplete ale genelor pentru fimbrilina, care sunt insa "tacute", neexprimate (engl. *silent genes*). Ele contin pe langa unele secvente conservate si unele foarte diferite. Functionarea lor este conditionata de fenomenul de *conversie a genelor*, care se produce printr-un mecanism asemanator celui descris sub denumirea de *modelul casetei*, care implica existenta unui situs de exprimare si deplasarea aleatorie a uneia din genele "tacute" in acest situs, care inlocuieste si deplaseaza gena anterior functionala. Astfel se sintetizeaza un nou tip de molecule de fimbrilina. Fenomenul explica incercarile nereusite de a obtine un vaccin anti-adezine pentru profilaxia infectiilor gonoreice, chiar si in cazul utilizarii unui vaccin polivalent. Un alt motiv de insucces al vaccinurilor anti-adezine in general, il constituie, dupa opinia unor autori, concentratia mica a anticorpilor specifici la nivelul mucoaselor.

Fenomenul de variatie antigenica produs *in vivo* ar fi determinat de presiunea imuna, care ar putea accelera evolutia sau selectia unor noi variante antigenice. Acest mecanism compenseaza lipsa sexualitatii propriu-zise si permite bacteriilor patogene o rapida si eficienta variatie fenotipica care le asigura diversitatea si adaptarea la presiunea imunologica a gazdei.

Fimbriile tip - 1C sunt in general asociate cu fimbriile P si maresc potentialul invaziv al acestora.

Fimbriile S nu sunt asociate cu patogenitatea. La *E.coli*, desi celulele recunosc glicoconjugate cu acid sialic, legarea lor fiind blocata cu inhibitori prezenti in concentratie normala in urina (in special de proteina Tamm - Horsfall).

Adezina 075 X favorizeaza colonizarea cailor urinare inferioare si reprezinta un factor important de virulenta, prin legarea de epiteliile lezate ale cailor urinare superioare.

Fimbriile tip 3 sunt produse de catre multi membri ai fam. *Enterobacteriaceae*, fiind detectate mai ales la tulpini aparținând genurilor *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* si *Providencia* si codificate de gena *mrkD*. Speciile de *Salmonella* rar produc acest tip de fimbrii, iar la tulpinile de *E. coli* nu au fost semnalate. Fimbriile de tip 3 prezente la enterobacterii sunt morfologic asemanatoare, netubulare, cu diametru mic (2- 4 nm); acest tip de fimbrii mediaza aglutinarea manozo-rezistenta a eritrocitelor tratate cu acid tanic, adera la colagenul tip V si este frecvent prezent la tulpinile de *K. oxytoca*.

2. Capsula. Unele bacterii au proprietatea de a elabora in anumite conditii de mediu, un anumit material macromolecular cu caracter vâcos, gelatinos. Substantele mucoide capsulare sunt de regula de natura polizaharidica (fiind numite exopolizaharide bacteriene), dar pot fi si de natura polipeptidica sau mixta (la *B. anthracis* si alti sporulati aerobi - polimeri de acid D-glutamic), motiv pentru care a fost introdus conceptul de E.P.S. – engl. *extracellular polymeric substances* - pentru a reuni toate substantele macromoleculare pericelulare. In functie de structura si raporturile sale cu celula bacteriana, substanta mucoida se poate prezenta sub urmatoarele forme:

1. microcapsula (cu o grosime sub 0,2 μm), alcătuiind un strat fin in jurul celulei, detectabil numai prin metode imunologice - de exemplu, antigenele de suprafata, care confera virulenta bacteriilor patogene);
2. capsula propriu-zisa sau macrocapsula (cu grosime depasind 0,2 μm , formatiune morfologic distincta si care poate fi evidentiata prin metode citochimice);

Capsula apare la microscop ca un halou incolor in jurul celulei bacteriene, cu dimensiuni variabile, fiind lipsita de membrana morfologic diferentiata. Capsula este strâns aderenta de peretele celular, datorita legarii polizaharidului capsular de acesta prin legaturi ionice si uneori covalente.

Prezenta capsulei da culturilor pe medii lichide un caracter vâcos, siropos, datorita difuzarii in mediu a unora dintre sustantele capsulare. Coloniile pe medii solide au un aspect umed, lucios si dovedesc o consistenta mucoasa atunci când sunt ridicate cu ansa de pe mediu. Consistenta vâscoasa, gelatinoasa, cât si refringenta caracteristica a acestor formatiuni se explica prin natura polizaharidica a moleculelor constituate (homopolizaharide si heteropolizaharide) si prin gradul lor înalt de polimerizare.

Uneori, compozitia chimica a capsulei (codificata genetic) este corelata cu specificitatea antigenica a celulelor respective si permite identificarea lor serologica in scop de diagnostic. Pe acest criteriu, al unor mici diferente in compozitia polizaharidelor capsulare la pneumococ (*Streptococcus pneumoniae*), au fost descrise peste 80 de tipuri serologice. La *E. coli* se cunosc

in jur de 70 de tipuri capsulare, materialul capsular fiind constituit din polizaharide acide localizate in membrana externa. Aceste tulpini pot produce numai infectii extraintestinale; tipurile K1 si K5 sunt cele mai comune printre tulpinile patogene de colibacili. Capsulele K1 sunt constituite din acizi polisialici si sunt identici cu polizaharidul capsular al bacteriei *Neisseria meningitidis* b. Anumite tipuri capsulare sunt slab imunogene, fapt care se datoreaza asemanarii materialului capsular cu anumite substante ale gazdei. Raspunsul imun slab al gazdei favorizeaza penetrarea bacteriilor in tesuturile gazdei si imbolnavirea acesteia.

Semnificatie biologica. Capsula nu este parte integranta din celula bacteriana, ci este o structura inerta, accesorie, cu caracter adaptativ, care rezulta din activitatea ei metabolica si care poate fi indepartata, fara a afecta viabilitatea celulei. La bacteriile patogene, capsula exercita un rol protector fata de actiunea fagocitelor, fie direct, impiedicând adeziunea la suprafata fagocitului, fie indirect, prin efectul chimiotactic negativ, antifagocitar, al substantelor de constitutie ale capsulei. Datorita acestui fapt, bacteriile patogene capsulate au o virulenta mai mare pentru om si animale, iar pierderea capsulei poate determina pierderea capacitatii de aderenta, invazie si implicit a virulentei.

3. **Glicocalixul** este o masa de filamente polizaharidice (reunite impreuna cu substantele capsulare in conceptul integrator de E.P.S.), atasate de lipolizaharidele din membrana externa a bacteriilor Gram negative sau pe suprafata mureinei bacteriilor Gram pozitive, formând in ansamblu o structura ca o pâsla pe suprafata celulei si asigurând fixarea ferma si adesea specifica a acesteia, de alte celule sau suporturi neanimate. Uneori, diviziunea bacteriilor in interiorul unui glicocalix poate produce o microcolonie de celule inglobate intr-un glicocalix comun.

Glicocalixul se formeaza numai la celulele aflate in conditii naturale, care apar la microscopul electronic de baleiaj inconjurate de o retea de fibre, ce adera unele de altele si de alte celule si suprafete inerte. S-a relevat faptul ca majoritatea suprafetelor in natura sunt acoperite de un asa-numit "biofilm", reprezentat de bacterii incluse intr-un film sau pelicula, intarita de polimerul adeziv secretat de bacteriile respective. In cazul in care acest polimer contine polizaharide specifice, el este mentionat ca "glicocalix". Fenomenul de adeziune prin intermediul glicocalixului a trezit mult interes pentru cercetarile de microbiologie orala. De exemplu, dupa ce diferite specii de streptococi colonizeaza diferite suprafete ale cavitatii bucale (limba, dintii), polizaharidele excretate intaresc adeziunea, conducând la aparitia placii dentare.

Placa dentara este o structura complexa formata din bacterii strâns asociate, inclavate intr-o masa amorfa, numita *matricea placii*, care localizeaza si concentreaza la nivelul sau activitatile chimice implicate in cariogeneza. Acumularile bacteriene din cavitatea bucala se

prezinta majoritar sub forma de biofilme care rezulta din interactiuni intre diferitele componente ale mediului bucal si componenta bacteriana ; termenul generic de *placa dentara* este utilizat pentru a descrie aceste biofilme. Placa dentara se dezvolta intr-un mediu complex, populat de diferite tipuri de microorganisme, expuse multor interactiuni si variatii diurne, care tin de particularitatile gazdei, de compozitia dietei etc. Bacteriile formeaza 60-70 % din volumul placii (reprezentate de mai mult de 300 de taxoni bacterieni care au putut fi identificati pâna in prezent in cavitatea bucala umana, ceea ce demonstreaza marea diversitate a microbiotei proprii acestui ecosistem), restul fiind reprezentat de matrice, respectiv de polimeri glucidici bacterieni extracelulari, de macromolecule din saliva. Colonizarea matricei este selectiva, speciile prezente pe suprafata dintelui fiind diferite de cele din mucoasa bucala, din placile subgingivale, din saliva. Cauza acestor deosebiri este capacitatea de legare selectiva a bacteriilor de suprafete.

Formarea placii. Legarea bacteriilor nu se face de smaltul pur, curat, ci de un film organic, *pelicula salivara*, formata prin depunerea mucinei din saliva, pe suprafata dintelui (fig.5). Este probabil ca acizii organici si unele enzime bacteriene ar contribui la precipitarea mucinei, favorizând legarea ei de dinte.

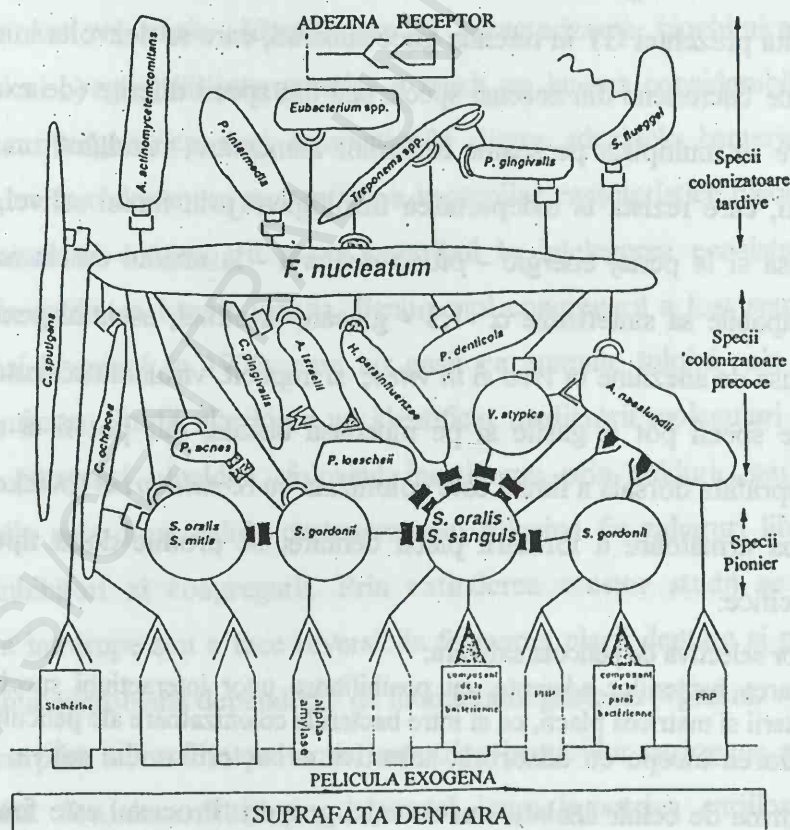


Fig. 5. Reprezentarea schematica a bacteriilor care interactioneaza cu pelicula care acopera smaltul dentar, compusa din mucine si alte mcromolecule salivare adsorbite la smaltul mineral. Bacteriile poseda liganzi *lectin-like* care se pot lega de anumite tipuri de molecule de mucine din pelicula salivara.

O specie colonizatoare timpurie a suprafeței dintelui este *Streptococcus gordonii* (speciile genului *Streptococcus* constituie în jur de 85% dintre speciile-pionier dintre bacteriile cultivabile, prezente pe suprafețele dentare la patru ore după profilaxia cu antibiotice), un component comun al plăcii supragingivale: atașarea inițială, ca și în cazul altor specii, presupune interacțiuni specifice între adevinele bacteriene și componente salivare adsorbite. Creșterea numărului bacteriilor și colonizarea consecutivă este dependentă de acumularea glucanului, sintetizat din fructoză, în prezența enzimelor produse de specia *Streptococcus mutans*. Această specie bacteriană este capabilă de a sintetiza glucani insolubili, care favorizează colonizarea suprafeței dintelui. Enzimele implicate în acest proces sunt numite *glucozil transferazele* (GT): după scindarea zaharozei în glucoză și fructoză (sub acțiunea invertazei streptococice), una dintre GT numită *dextranzaharaza* polimerizează glucoza cu formare de glucan solubil în apă (care conține predominant legături α -1, 6- glucoză); o altă GT, numită *mutansintetaza*, participă la sinteza de glucan insolubil în apă (care conține predominant legături α -1, 3- glucoză); pentru a sintetiza glucan insolubil, această enzimă necesită fie dextran exogen, fie sinteza concomitentă de glucan solubil. Glucanul adera de smalțul dentar, iar biosinteza lui continuă datorită prezentei GT în rețeaua glicocalixului, care se dezvoltă în continuare, capturând mai multe celule bacteriene din aceeași specie sau din specii diferite (de exemplu: *Streptococcus salivarius*) care se multiplică pe seama resturilor alimentare, rezultând un depozit galbui foarte aderent la dinți, care rezistă la îndepărtarea fiziologică (prin fluxul salivei, masticatie, mișcările limbii), nu însă și la periaj energetic - *placă dentară* - la nivelul căreia are loc inițierea cariei. Mutantele incapabile să sintetizeze α -1,3 - glucan, insolubil, esențial pentru cariogeneză, au o capacitate redusă de adeziune *in vivo* și *in vitro*, și implicit, virulența scăzută în cariogeneză.

Aceste specii pot fi găsite și pe mucoasa bucală, dar pot fi și agenți ai endocarditei infecțioase. Suprafața dorsală a limbii este colonizată cu *S. salivarius* (Wicken, 1980).

În etapa următoare a formării plăcii dentare, se produc două tipuri de interacțiuni ale bacteriilor specifice:

1. legarea lor selectivă de pelicula salivară;
2. multiplicarea bacteriilor aderente, cu posibilitatea unor interacțiuni specifice adezive și coezive, între bacterii și matricea plăcii, ca și între bacteriile colonizatoare ale peliculei salivare.

Colonizarea începe cu adsorbția selectivă a bacteriilor din salivă, pe suprafața peliculei salivare sub formă de celule izolate sau de mici grupuri. Procesul este foarte selectiv, dovadă și faptul că microorganismele care adera preponderent (*Streptococcus sanguis* și *Actinomyces viscosus*), cu un rol esențial în inițierea genezei plăcii, nu sunt cele mai numeroase din salivă

(aprox. 10^3 celule bacteriene/ ml). Bacteriile legate de pelicula încep să se multiplice, la început dispuse aleatoriu, formând microcolonii și apoi un strat bacterian extins, de care adera noi bacterii din mediu.

Mecanismele de legare a bacteriilor în placa dentară sunt supuse aceluiași reguli generale ale adeziunii cu unele elemente particulare: diferitele macromolecule salivare favorizează apariția de agregate bacteriene, dintre care cele mai mici adera la pelicula salivară. Materialul polimeric se leagă de pelicula prin legături de hidrogen, ionice și hidrofobe, în prezența Ca^{2+} . Adsorbția proteinelor salivare și a altor substanțe pe hidroxiapatita dentară se realizează pe calea atracțiilor electrostatice ce implică participarea unor grupări fosfat de pe suprafața minerală. Un rol semnificativ revine acizilor teicoici, care contribuie la sarcina electronegativă a bacteriilor, fiind capabili să formeze punți cu Ca^{2+} între smalț și pelicula. În legarea specifică, ireversibilă, un rol esențial revine adezinelor de pe suprafața bacteriilor (de exemplu, fimbrii), care reprezintă un adevărat cod chimic preformat, menit să permită recunoașterea și legarea de anumite macromolecule cu rol de receptori specifici de pe dinți și pelicula.

Formarea plăcii dentare este un proces complex în care agregarea interbacteriană (sau coagregarea) joacă un rol cheie. Identificarea și caracterizarea biochimică a mediatorilor moleculari specifici ai coagregării intergenerice a trezit un interes considerabil. Răspunzătoare pentru coagregarea intergenerică sunt interacțiunile dintre adezinele bacteriene și receptorii glucidici, care conduc la o depunere secvențială a bacteriilor caracteristice plăcii dentare umane. Examinarea mecanismului coagregării poate contribui la înțelegerea ecosistemului microbial complex, prezent în cavitatea bucală umană. Fenomenul coagregării a fost semnalat prima dată de către Gibbons și Nygaard în 1970, care au găsit că anumite tulpini ale plăcii bacteriene agregă când sunt mixate. Studii ulterioare au identificat mediatorii moleculari ca fiind proteine complementare și receptori glucidici, folosind inactivarea prin căldură sau prin tratare cu proteaze a uneia din cele două celule partenere, sau folosind fie zaharuri libere, fie anticorpi monoclonali, ca inhibitori ai coagregării. Prin extinderea acestor studii se pot găsi agenți terapeutici pentru a întrerupe sau a face reversibilă formarea plăcii dentare și prin analogie, alte fenomene de aderență microbiană dependente de interacțiuni proteina / glucid.

Rolul anticorpilor salivari în protecția împotriva bacteriilor cariogene este în prezent un subiect controversat. S-a demonstrat că răspunsul imun împotriva cariilor implică s-Ig A (imunoglobuline secretoare), transportate prin celulele epiteliale ale glandelor salivare prin intermediul unui receptor pentru poli-Ig. Este binecunoscut faptul că majoritatea adulților prezintă un număr de carii dentare, fiind deci susceptibili la carii (SC), în timp ce numai puțini

indivizi sunt rezistenti la carii (RC). Exista date care arata ca o susceptibilitate scazuta la carii dentare este asociata cu nivele crescute de anticorpi s-Ig A fata de celulele intregi de *S. mutans*. Nu s-a observat o crestere selectiva a subclasei de s-Ig A₂ rezistente la proteinaze. Cercetarile au aratat ca anticorpii indusi pe cale naturala impotriva tulpinilor de *S. sobrinus* (serotip al speciei *S. mutans*) si *S. sanguis*, chiar in cantitati mari nu sunt suficienti pentru a inhiba procesul de cariogeneza. acest mijloc de protectie al organismului este depasit de catre bacteriile patogene.

Semnificatie biologica. Dupa Costerton, adevarata suprafata functionala a tuturor celulelor (bacteriene, vegetale si animale) este glicocalixul - o retea ca o pâsla de fibre polizaharidice. Glicocalixul este prezent numai in medii naturale competitive, populate de mai multe tipuri de bacterii, in care selectia favorizeaza celulele protejate de glicocalix, capabile sa adere prin intermediul lui la diferite substraturi.

Prezenta glicocalixului, care determina uneori formarea de microcolonii bacteriene, creeaza conditii favorabile de nutritie, prin mentinere si concentrarea enzimelor degradative eliberate de bacterii si active pe substratul de fixare - de ex., celule animale. Aceasta forma microcoloniala de crestere a fost observata intr-o varietate de infectii bacteriene, incluzând infectiile asociate dispozitivelor protetice si osteomielitele. In acelasi timp el creeaza un rezervor de hrana pentru bacterii prin legarea diferitilor ioni si molecule care provin din mediu sau sunt eliberate prin digestia enzimatica a celulelor moarte, care sunt astfel recirculate.

Datorita glicocalixului, bacteriile se leaga de structurile polizaharidice similare de pe suprafata celulelor animale, prin legaturi polare formate pe calea ionilor. In cazul unor bacterii patogene, fixarea are un grad important de specificitate pentru glicocalixul celulei-gazda (de exemplu, vibriionul holerici se leaga de portiunea apicala a celulelor intestinale umane cu "marginie in perie", gonococul de celulele uretrale.

La unele bacterii Gram negative capsulate cum ar fi *Klebsiella pneumoniae*, care se numara printre cauzele de morbiditate si mortalitate prin infectii nosocomiale (studiile epidemiologice au relevat ca rezervorul de infectie este tractul digestiv al pacientilor), s-a observat un aspect interesant: o caracteristica a cresterii acestor bacterii este producerea nu numai a unui strat polizaharidic capsular (CPS) subtire, ci si a unei mari cantitati de CPS liber, care este impregnat cu LPS toxic, contribuind la patogenitate. CPS liber, circulat, poate lega si neutraliza anticorpii care ar putea opsoniza si ataca bacteriile; productia de anticorpi opsonizanti este un aspect important al imunitatii fata de *K. pneumoniae*, demonstrat de analizele *in vitro* care au identificat anticorpi anti-CPS specifici ca opsonine, importante pentru aderența la membrana fagocitelor. *In vitro* celulele de *K. pneumoniae* adera atât la substratul celular, cât si

intre ele, deci prezinta o aderenta agregativa mediata de stratul capsular, care explica dificultatea tratarii infectiilor determinate de acest patogen oportunist. A fost identificata o adezina nefimbriala denumita CF29K, care determina un fenotip de aderenta difuza, codificata de operonul *cf29*, localizat pe o plasmida conjugativa impreuna cu alte gene care codifica factori de virulenta (de ex. aerobactin) si gene de rezistenta la antibiotice (β -lactamaza). Pentru rezolvarea infectiilor produse de *K. pneumoniae* s-a incercat stimularea imunitatii, utilizând antigene capsulare K-specifice ca vaccinuri anti-adezine. Imunoterapia K-specifica a trebuit sa acopere numeroase serotipuri dintre cele 70 de tipuri capsulare serologic distincte identificate in cadrul acestei specii. Un vaccin 24-valent K-specific, aflat in prezent in faza de testare clinica, acopera 60-70 % din izolatele bacteriemice de *K. pneumoniae*. Raspunsul imun in imunoglobuline este crescut dupa vaccinare. Pentru aceasta bacterie si alte bacterii capsulate, cantitatea de CPS este corelata direct cu virulenta. A fost utilizat *in vitro* salicilatul pentru a reduce exprimarea CPS de catre câteva serotipuri de *K. pneumoniae*; s-a demonstrat recent ca inhibarea exprimarii capsulei cu salicilat creste inglobarea fagocitara a bacteriilor. De asemenea expunerea celulelor la concentratii subletale de antibiotic (brodimoprim), dar care poate inhiba sinteza structurilor de suprafata, a redus aderenta bacteriei la epiteliul traheal cu 41-67%.

Prezenta glicocalixului poate determina un efect protector complex pentru celule, asigurând fixarea si mentinerea acestora in mediile natural sterile (de exemplu, caile urinare) fara a fi indepartate de fluxul urinar. De asemenea, impiedica fagocitarea bacteriilor de catre leucocitele polimorfonucleare, ca si accesul si fixarea anticorpilor specifici din organismul infectat, deci protejeaza bacteriile de reactiile de aparare ale gazdei. S-a demonstrat *in vitro* ca glicocalixul inhiba functiile fagocitare normale, cum ar fi mobilitatea de-a lungul gradientului chemotactic si producerea de metaboliți intermediari ai oxigenului, ca si raspunsul proliferativ al celulelor mononucleare din sângele periferic la mitogene, cum ar fi fitohemaglutinina.

Studii recente demonstreaza ca glicocalixul stafilococilor coagulazo-negativi poate activa producerea de catre monocite a prostaglandinei E_2 (PGE_2), ceea ce contribuie la inhibarea proliferarii limfocitelor T. PGE_2 joaca un rol semnificativ in raspunsul inflamator acut. Apare cumva paradoxal ca glicocalixul care ar putea fi astfel aparent benefic stafilococilor coagulazo-negativi in initierea infectiilor, in acelasi timp stimuleaza monocitele sa secrete produși proinflamatori. Exista numeroase exemple in care bacteriile, prin structurile lor de suprafata, ca si prin metaboliții lor care pot fi factori de virulenta, induc sinteza de citokine de catre celulele organismului gazda, influentând prin aceasta evolutia unui proces infectios.

4. **Flagelii** sunt apendice filamentoase, unice sau multiple, dispuse pe suprafața bacteriilor, reprezentând organele de locomotie tipice organismelor procariote, implicate și în chemotaxie, deci în deplasarea orientată preferențial, sub efectul unor gradienti de concentrație ale diferitelor substanțe chimice aflate în mediul de viață al bacteriilor.

S-a dovedit că rolul flagelilor este mult mai complex în biologia celulelor bacteriene, prezenta lor la bacteriile patogene constituind un factor de virulență, prin funcția de stimulare a adeziunii la diferite epitelii și prin capacitatea de a facilita patrunderea prin stratul de mucus ce acoperă țesuturile epiteliale.

Rolul lor în virulență este controversat, deși este acceptată ideea potrivit căreia capacitatea bacteriilor patogene de a-și modifica poziția în spațiu prin mobilitate activă este de importanță esențială în virulență. Rolul flagelilor în virulență a fost studiat, în special, cu ajutorul mutantelor neflagelate sau al mutantelor "neinteligente" (celule flagelate cu defecte în sistemul de transducție a energiei sau flageli care se rotesc, dar prezintă anomalii de răspuns chemotactic). Mutantele neflagelate sau flagelate, dar nechemotactice de *Salmonella sp.* și *Campylobacter jejuni* colonizează mai greu suprafața epitelilor decât cele mobile și chemotactice. În cazul bacteriei *Pseudomonas aeruginosa* s-a demonstrat că tulpinile mobile care infectează arsurile sunt mai virulente decât cele imobile. Mai mult, varianta mobilă a bacteriei ar fi mai virulentă, formând biofilme la nivelul țesutului pulmonar al bolnavilor cu fibroză chistică, după mecanismul descris pentru mediile naturale subacvatice: biofilm alcătuit din microcolonii bacteriene, acoperite de o matrice exopolizaharidică de la marginile careia se eliberează celule foarte mobile care invadează țesutul sănătos.

La *Vibrio cholerae* s-a constatat că motilitatea și chemotaxia constituie factori de virulență. Prin tratarea bacteriilor cu anticorpi antiflagelari motilitatea este inhibată. Aderența are rolul de a reduce eliminarea bacteriilor prin peristaltism și în același timp oferă bacteriilor un mediu mai favorabil pentru creștere. S-a demonstrat că mutantele imobile, dar normal enterotoxigene, au o virulență diminuată.

Mobilitatea în general ar fi un factor important pentru virulență. Astfel, capacitatea de deplasare rapidă în medii vâscoase, cum sunt cele din organism, observată la *Borrelia*, *Leptospira* și *Treponema*, ar fi un factor esențial pentru evitarea fagocitozei, fiind capturate cu mare dificultate de către fagocite. La aceste bacterii cu lungime mare și foarte mobile (ulterior și la enterobacteriile condiționat-patogene, ca și la microfungi) a fost semnalat un tip special de fagocitoză – *coiling* fagocitoză, caracterizată prin formarea unui singur pseudopod, care se

rasucește în jurul bacteriei, trăgând-o în interiorul fagocitului; nu se cunoaște semnificația precisă a acestui proces (fig. 6).

De asemenea, la *Mycoplasma sp.* infecțiozitatea este dependentă de capacitatea celulelor de a se deplasa prin alunecare (datorită lipsei peretelui celular), de a pătrunde prin stratul de mucus și de a ajunge astfel în contact cu receptorii de adeziune prezenți pe membrana

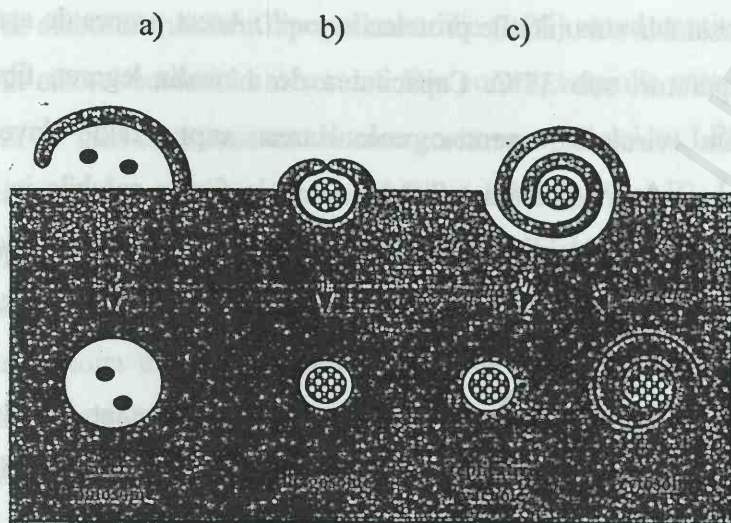


Fig. 6. Schema reprezentând caracteristicile morfologice ale macropinocitozei (a), ale fagocitozei convenționale (b) și ale fagocitozei tip *coiling* (prin înfășurare) (c).

celulelor-gazda, aderența fiind favorizată de asemanarea biochimică a celor două membrane. Prin tehnica microcinematografiei cantitative, s-a demonstrat că tulpinile virulente de *M. pneumoniae* sunt mobile, iar cele avirulente sunt imobile și au o aderență redusă. În ciuda acestor fapte concrete, concluzia este totuși că, în absența chemotaxiei, mobilitatea singură ar reprezenta un avantaj minor pentru virulența bacteriană.

Flagelii sunt structuri imunogene (antigene H) față de care organismul gazda produce anticorpi. Ca rezultat al coevoluziei gazda - parazit, acesta din urmă "contraatacă" sintetizând antigene flagelare diferite (Ag H₁ și Ag H₂); fenomenul a fost descris sub denumirea de "variație de fază a antigenelor flagelare de la *Salmonella sp.*", ca un sistem de variație de fază, controlat genetic de genele structurale cromosomale H₁ și H₂; fenomenul a fost semnalat încă din 1929 de către Andrews. După unii autori, variația de fază a flagelilor, cu rol deosebit în patogenitate și în capacitatea bacteriilor de a se adapta la diferite medii ostile în cursul infecției și de "a înșela" efectorii sistemului imunitar, s-ar realiza aleatoriu o dată la fiecare 10³-10⁵ generații.

5. "Curli". La *E. coli* s-a semnalat prezența unei a treia clase de organite de suprafață (în afara de flageli, pili / fimbrii) pentru care s-a propus denumirea de "curli" (engl. *curl* = buclă, ondulație, încolăcitură) (Olsen și colab., 1989).

Sunt structuri de suprafață răsucite, rigide, cu diametrul de circa 2 nm, compuse dintr-un singur tip de subunități, *curlina*, care diferă de toate celelalte proteine pili cunoscute, fiind sintetizată în absența unui peptid semnal clivabil. Agregarea laterală a fibrelor individuale produce structuri considerabil mai groase. Deși gena care codifică această subunitate structurală "crl" este prezentă și transcrisă la majoritatea izolatelor naturale de *E. coli*, numai anumite tulpini sunt capabile de a asambla subunitățile proteice în *curli*. Acest proces de asamblare se desfășoară preferențial la temperaturi sub 37°C. Capacitatea de a media legarea fibronectinei poate fi o proprietate asociată virulenței pentru colonizarea suprafețelor învelite în fibronectine (glicoproteine cu greutate moleculară mare, prezente în formă solubilă în plasma și alte lichide biologice și în formă insolubilă în celule, având funcția de opsonine nespecifice; aderă la resturi celulare, de exemplu, de țesutul necrozat al plagilor, favorizând infectarea acestora). Structuri tip « curli » au fost evidențiate și la *Salmonella typhimurium*.

6. Stratul proteic S. Asa-numitul strat S, reprezentat de două straturi proteice paracristaline, face parte dintre cele mai primitive structuri parietale, fiind prezent la toate eubacteriile.

Semnificația biologică. Se considera de asemenea că stratul S este implicat în adeziunea celulară și recunoaștere. O atenție deosebită s-a acordat stratului S prezent la bacteriile patogene, la care este considerat ca factor de virulență, necesar pentru atașarea la suprafețe, etapa semnificativă în colonizarea și inițierea unei infecții la o gazdă sensibilă, la care există receptori celulari pentru această structură. Această adezină a fost mult studiată la *Aeromonas salmonicida*, dar și la numeroase bacterii patogene pentru om, cum ar fi: *Helicobacter pylori*, *Chlamydia sp.*, *Rickettsia sp.*, *Treponema sp.*, *Bordetella sp.*, *Bacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Clostridium sp.*

*

S-a demonstrat că unele bacterii patogene pot avea mai multe tipuri de adezine. Bacteria *Pseudomonas aeruginosa* este un exemplu tipic de microorganism cu multiple mecanisme de aderență, care includ exopolizaharide, fimbrii, adezine specializate pentru acidul sialic, manoză, N-acetil manozamină, interacțiuni proteină-proteină, interacțiuni hidrofobe (adezine de lipide).

P. aeruginosa este un patogen oportunist care produce complicații majore la pacienții cu fibroză chistică, dar și o cauză semnificativă a morbidității la cei cu arsuri, cancer și alte boli în care este prezentă imunodepresia. Deși mulți produși extracelulari ai bacteriei contribuie la virulența sa, structurile filamentoase cunoscute ca pili tip IV, joacă un rol major favorizând aderența bacteriilor la celulele epiteliale. Infecțiile cronice ale tractului respirator cu tulpini de *P. aeruginosa* care produc mari cantități de exopolizaharide mucoide (MEP) = alginati, constituie

factorul patogen major al bolilor pulmonare cronice si al mortalitatii prin acestea, la pacientii cu fibroza chistica. Mecanismul initierii infectiei la acesti pacienti, se explica prin dereglarile in biochimia si fiziologia mucusului respirator al pacientilor si exprimarea adezinelor pentru celulele epiteliale si mucine de catre celulele de *P. aeruginosa*. Tulpinile care initiaza infectia sunt fenotipic diferite de cele gasite in infectia cronica. Mai exact, tulpinile din faza initiala a infectiei au tendinta sa elaboreze un strat lipopolizaharidic (LPS) neted continând lanturi O lungi, care sunt rezistente la efectul bactericid al serului. Din contra, tulpinile care colonizeaza in mod cronic, sufera variatii de faza care constau in emergenta unor tulpini cu LPS rugos, sensibile la actiunea serului si care produc mari cantitati de MEP (LPS tip A si B). Urmeaza un raspuns imun intens la multiplele antigene bacteriene, incluzând MEP, dar anticorpii produsi in timpul infectiei sunt inefficienti in eliminarea bacteriilor. S-a sugerat ca incapacitatea pacientilor cu fibroza chistica de a actiona eficient in infectiile cronice cu *P. aeruginosa*, este asociata cu producerea de anticorpi anti-MEP care nu pot media citotoxicitatea anticorpo-dependenta a bacteriilor *in vitro*. S-a demonstrat ca protectia rozatoarelor impotriva infectiilor endobronhiale cu tulpini de *P. aeruginosa* mucoide este mediata de anticorpi opsonici, dar nespecifici fata de MEP. Aceste opsonine depoziteaza si C3b la suprafata stratului de MEP, unde sunt incapabile sa interactioneze cu receptorii de complement de pe leucocitele polimorfonucleare, in special *in vivo*, unde bacteriile cresc in microcolonii incluse in MEP. Studii recente vin in sprijinul acestei idei: anticorpii serici de la pacientii de fibroza chistica, colonizati in mod cronic, au o capacitate semnificativ reduca de a media omorârea celulelor mucoide de *P. aeruginosa* crescute ca un biofilm *in vitro*. Dupa unii autori, alginatul si alte antigene (LPS) ar determina o stimulare policlonala a limfocitelor B, care ar avea ca efect hipergamaglobulinemia din cursul fibrozei chistice; insa severitatea acestei boli se coreleaza invers proportional cu titrul anticorpilor, paradox ce poate fi explicat prin calitatea inadecvata a anticorpilor care nu actioneaza ca opsonine, dar contribuie la inflamatiile mediate de complexe imune (hipersensibilitate tip III).

Un alt exemplu de bacterie care posedă multiple structuri adezive (fimbrii, capsula si LPS) la substratul celular sensibil este *Porphyromonas gingivalis*; este o bacterie Gram negativa anaeroba, pigmentata in negru, asociata cu câteva boli ca periodontita adultului, periodontita juvenila generalizata, abcese periodontale si periodontita refractara. Fimbriile acestei bacterii sunt implicate in aderenta la celulele-gazda, iar superoxidismutaza produsa de aceasta bacterie este o enzima considerata a fi implicata in protejarea celulelor impotriva neutrofilelor. O alta bacterie implicata in patologia periodontitei este *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la care

adeziunea este mediata de mai mult decât de un mecanism, fapt dovedit de caracterul adeziv al tulpinilor nefimbriate *in vitro*.

Receptori de adezine. Integrine.

Rolul receptorilor celulari a fost demonstrat de Sellwood si colab. (1975). S-a observat ca sensibilitatea omului si a animalelor la tulpini entero- si uropatogene de *E. coli* este corelata cu un numar mare de receptori specifici de pe membrana epitelilor respective. Rezultatele cercetarilor au dovedit ca procesele de adeziune si invazie necesita interactiunea specifica dintre adezinele agentilor infectiosi si tinta lor = receptorii specifici de pe suprafata celulelor sensibile.

S-a observat, de asemenea, ca pe celulele infectate cu anumite virusuri pot aparea noi receptori de suprafata, absenti pe celulele normale. Fenomenul ar explica aparitia infectiilor secundare bacteriene postviroze (ca de exemplu, pneumonia bacteriana post-gripala). Astfel, o gazda normal rezistenta devine sensibila, putând lega diferite bacterii patogene si conditionat-patogene in cursul si ca urmare a infectiei virale.

Reactia *adezine / receptori* este bazata pe complementaritate stereochemica. Este general acceptat faptul ca celulele se recunosc una pe cealalta prin perechi de structuri complementare de pe suprafata lor: o structura de pe o celula poarta informatie biologica codificata, pe care structura de pe cealalta celula o poate descifra. Aceasta idee reprezinta o extindere a ipotezei lacat-cheie, formulata inca din 1897 de catre Emil Fisher (pentru interactiunea enzima-substrat), ipoteza care a devenit din 1920 una din teoriile centrale ale biologiei celulare (fig. 7).

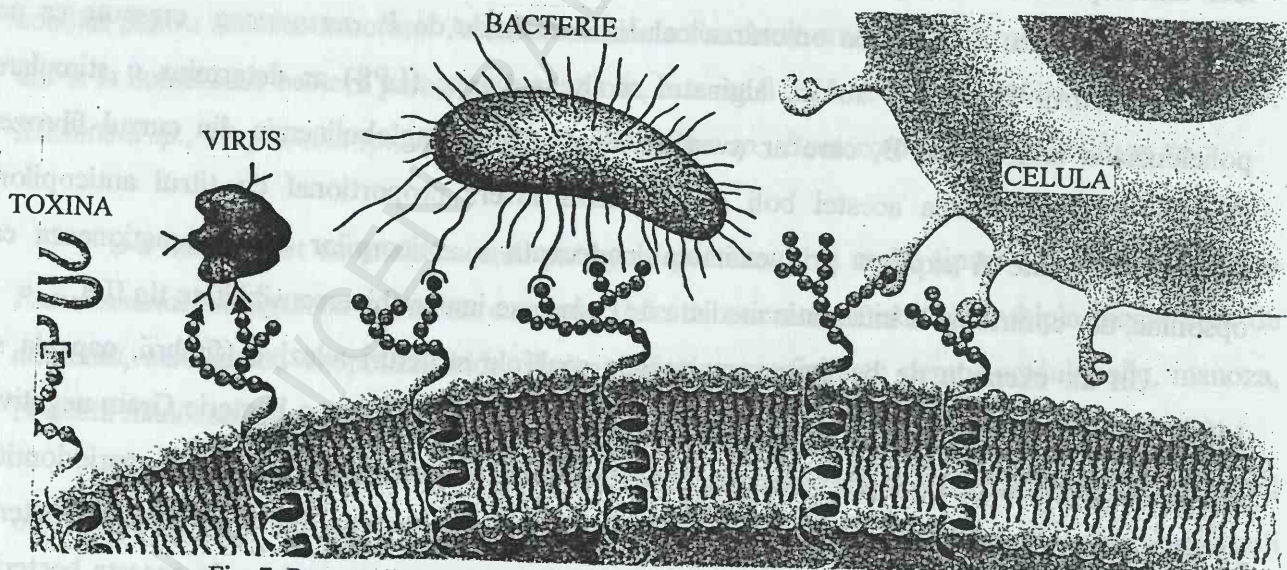


Fig. 7. Receptorii membranari ai celulelor Ek (GP, GL) servesc ca puncte de atasare pentru alte celule, bacterii, virusuri, toxine s.a.

Aceasta reactie este uneori riguros specifica, iar in alte cazuri este total nespecifica, o anumita bacterie putând infecta celule eucariote de proveniente foarte diferite, care au modalitati

comune de legare și internalizare. Astfel, s-a demonstrat că *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.* etc. pot infecta la fel de eficient celulele intestinale umane și liniile celulare embrionare de *Drosophila*. În schimb, *Streptococcus pyogenes* se localizează frecvent în faringe și rar în caile urinare, iar *E. coli* colonizează frecvent epiteliul intestinal și al cailor urinare și foarte rar pe cel respirator. Bacteria *Neisseria gonorrhoeae* este un alt exemplu de infecțiozitate cu specificitate de țesut, în sensul că aderă la celulele umane ale epiteliului genital și oral, dar nu și la celulele altor organe sau altor specii animale. Acest fapt explică de ce omul este gazda exclusivă pentru *N. gonorrhoeae*, alte mamifere neputând contracta gonoreea. Prin acest mecanism, distribuția receptorilor celulari și diferențele de specificitate explică tropismul diferit al microorganismelor patogene, care se pot lega exclusiv sau preferențial de anumite celule și niciodată de altele.

Prezența receptorilor complementari nu echivalează întotdeauna cu capacitatea bacteriilor de a coloniza țesutul, ceea ce sugerează că procesul de aderență implică și corectă prezentare, orientare și accesibilitatea adezinelor și receptorilor. Pentru a aderă, viabilitatea celulelor nu este obligatorie. Astfel, s-a realizat inhibarea capacității de aderență și invazie a unor bacterii enteroinvazive (*E. coli* enteropatogenă, *Salmonella typhimurium*) la celule intestinale umane cultivate *in vitro*, prin preaderarea unor celule de *Lactobacillus acidophilus*, viabile sau omorâte prin căldură. Experimentul a demonstrat că odată ocupate situsurile de atașare de către lactobacili, acestea nu mai sunt disponibile pentru aderență enteropatogenilor.

Au fost identificate cinci familii structurale principale de molecule de adeziune: *integrinele*, *selectinele*, *proteine din superfamilia imunoglobulinelor*, *mucinele* și *cadherinele*.

Integrinele formează o superfamilie de receptori înrudiți, având o varietate de funcții necesare pentru atașarea celulei eucariote de proteinele de matrice extracelulară, fagocite și pentru aderență celulară în general. Aceste molecule de adeziune - integrinele mediază recunoașterea intercelulară, importantă pentru diferite procese biologice, incluzând morfogeneza embrionului, procesul de vindecare și răspunsul imun.

Pentru a apăra organismul împotriva agenților infecțioși, celulele sistemului imunitar trebuie să fie capabile să circule ca celule neaderente în sânge și limfă și de a migra ca celule aderente spre țesuturile infectate. Pentru a controla această tranziție rapidă între starea aderentă-neaderentă, leucocitele sunt echipate cu diferiți receptori de adeziune. O familie a acestor molecule, **selectinele** sunt importante în dirijarea traficului leucocitelor, localizarea în țesuturi și recrutarea lor în zonele inflamate. Funcția majoră a selectinelor este de a regla interacțiunile dintre leucocite și celulele vasculare endoteliale, care constituie pasul inițial și regulator al mișcării leucocitelor în organele limfoide și nelimfoide.

O alta familie de molecule de adeziune o formeaza **cadherinele**, implicate in agregarea homotipica – Ca^{2+} dependenta a celulelor nelimfoide; are rol structural in jonctiunile intercelulare si este receptor specific pentru proteina *internalina* din membrana externa a bacteriei *Listeria monocytogenes*, facilitând aderenta acesteia la celulele intestinale.

Integrinele leaga mai multe tipuri de proteine prezente in sânge si in matricea extracelulara, incluzând fibronectinele, fibrinogenul, vibronectinele, laminina, colagenul tip I, osteopontina, precum si *adezinele microorganismelor patogene*. Structura generala a integrinelor este aceea a unui heterodimer alcatuit din două subunitati polipeptidice denumite α si β , modelul lor general de structura incluzând un domeniu extracelular, un domeniu transmembrantar si unul intracitoplasmatic, corespunzând extremitatilor -COOH terminale. Cele doua domenii extracelulare participa la interactiunea cu ligandul, in prezenta ionilor de Ca^{2+} si Mg^{2+} . Modul de legare a diferitelor proteine de integrina - receptor a fost inteles din momentul in care s-a demonstrat ca toate proteinele cu care interactioneaza au in structura lor una sau mai multe secvente [Arg-Gly-Asp (RGD)], conservate de-a lungul evolutiei si care actioneaza ca secvente-semnal de recunoastere. Desi secventa de legare (RGD) este aceeaasi la diferitele proteine de adeziune, celulele eucariote, prin integrinele lor, le pot recunoaste individual specificitatea, deoarece in fiecare caz, orientarea spatiala a resturilor de (Arg-Gly-Asp) este unica si caracteristica. In felul acesta, fiecare integrina recunoaste un anumit ligand care contine o secventa (RGD) sau un numar limitat de liganzi. Sistemul de adeziune bazat pe secventa RGD are un rol important in relatia parazit-gazda; microorganismele poarta pe suprafata lor structuri care mimeaza ca specificitate integrinele celulei-gazda, ceea ce demonstreaza ca in cursul evolutiei, parazitii au dezvoltat aceste structuri complementare proteinelor de suprafata (receptori preexistenti) ale celulelor, care le favorizeaza aderarea si patrunderea in celulele gazdei.

Din categoria integrinelor fac parte si proteinele receptor de complement [PrMac-1(CR₃), s.a.], care participa la inglobarea in fagocite a mai multor patogeni (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania donovani* etc.). Capacitatea de a utiliza integrinele nu este limitata la bacteriile parazite intracelular. Astfel, *Bordetella pertussis* (agent patogen al tusei convulsive) contine o proteina de suprafata - *hemaglutinina filamentoasa (FHA)*, care are functie de adezina. Ea are in structura sa secventa RGD, care îi permite sa interactioneze cu o integrina de pe epiteliul ciliat al cailor respiratorii umane, favorizând colonizarea acestuia.

Fibronectinele (FN), numite si *proteine de reglare celulara* sau *factorul de adeziune celulara*, formeaza o clasa de glicoproteine macromoleculare (g.m. 220 kDa) multifunctionale.

Sunt prezente în forma solubilă în sânge ($\sim 20 \mu\text{g/ml}$) și în forma insolubilă în țesuturi (matricea extracelulară). Molecula de FN constă din domenii înalt structurate ce conțin situsuri de legare pentru macromoleculele cu care interacționează. Situsul de legare cu celulele de mamifere are în structură sa secvența (RGD). FN plasmatică este produsă de hepatocite, de macrofage și de celulele endoteliale. Are funcția esențială de a asigura aderența de celulele de mamifer și o mare afinitate pentru colagen, fibrinogen, fibrina, proteoglicani, pentru suprafața celulelor eucariote, dar și pentru cele bacteriene, glicoproteinele virale, adevinele protozoarelor parazite etc. Dintre numeroasele exemple studiate, privind rolul FN în aderența bacteriilor patogene, cel mai cunoscut și complex în același timp este cel al bacteriei *Streptococcus pyogenes*, frecvent prezentă în orofaringe și pe mucoasa căilor respiratorii superioare. Eliminată în aer prin picăturile de salivă, bacteria poate afecta un alt organism numai dacă adera de suprafața mucoaselor acestuia și le colonizează prin multiplicare.

Mecanismul fenomenului de aderență de mucoase este explicat prin formarea unor punți care implică participarea fibronectinelor, a acizilor lipoteichoici și a proteinei M din structura peretelui celular al streptococilor, datorită interacțiunii dintre poli, de o parte – glicerofosfați, iar de cealaltă parte – resturile de lizină din proteine. Această interacțiune are drept consecință expunerea în mediu a extremității hidrofobe a acidului lipoteichoic, care se leagă de situsuri complementare din structura FN, respectiv spre extremitatea NH_2 terminală a acesteia. Extremitatea $-\text{COOH}$ a fibronectinei se leagă de suprafața celulei epiteliale realizând astfel o “punte” bimoleculară (acid lipoteichoic-fibronectina), care fixează bacteria de mucoasa (fig. 8). Proteina M acționează ca un mecanism adițional, având o activitate similară lectinelor și utilizând ca receptor fucoză sau galactoză de pe suprafața celulelor faringee. În funcție de natura celulei de care este legată, efectul asupra bacteriei este diferit. Când funcția adezivă leagă bacteria de granulocitele neutrofile, efectul este opsonizant și are drept urmare fagocitarea bacteriei și distrugerea ei. Când bacteria este legată de fibronectina tisulară, ea furnizează o modalitate de legare care contribuie eficient la virulența bacteriei.

Pot fi date și alte exemple de bacterii care se leagă de proteinele matricei extracelulare, care mediază astfel adeziunea bacteriană la țesuturile-gazdă: *Treponema pallidum* se leagă de o secvență RGD a fibronectinei, *Yersinia enterocolitica* se atașează în special de fibronectină, *Toxoplasma gondii* și *Streptococcus gordonii* leagă laminina, *Staphylococcus saprophyticus*, un agent cauzal important al infecțiilor tractului urinar, leagă FN și laminina.

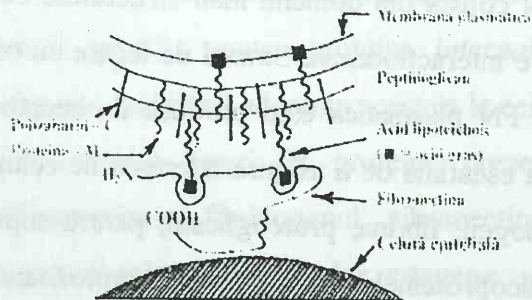


Fig. 8. Aderenta la celula-gazda a bacteriei *Streptococcus pyogenes* se realizeaza printr-o punte de fibronectina (FN). Moleculele de acizi lipoteichoici secretate de catre bacterii se leaga cu extremitatea hidrofila de proteina M, iar cu cea hidrofoba de situsuri complementare de pe molecula de FN, al carei capat carboxiterminal se leaga puternic de celulele epiteliale. Rezulta o aderenta nespecifica a streptococilor la celulele epiteliale, printr-o punte de FN (dupa Beachey si col., citati de Zarnea, 1994).

Semnificatia medicala a biofilmelor microbiene:

De la primele observatii asupra procesului de aderenta bacteriana, urmate de recunoasterea ubicuitatii bacteriilor aderente, s-au facut progrese in intelegerea fiziologiei microorganismelor sesile si a devenit clar ca bacteriile crescute in biofilme reprezinta o faza de crestere distincta, o forma de diferentiere a bacteriilor care sunt profund diferite de faza de crestere planctonica studiata atât de asiduu in timpul celor 150 de ani care au urmat descoperirilor lui Pasteur. Descoperirea cea mai importanta a ultimilor ani este aceea ca bacteriile aderente sunt fenotipic profund diferite de bacteriile aflate in suspensie. Modificarile cele mai semnificative se produc la nivelul invelisului celular si al sistemelor de transport.

Relativ recent s-a descoperit ca aderenta determina exprimarea unui factor σ care derepreseaza un mare numar de gene, asa încât celulele biofilmului sunt net diferite din punct de vedere fenotipic, de celulele libere in suspensie. Fiecare bacterie din biofilm traieste într-o micronisa, într-o comunitate microbiana complexa care are o <<homeostazie>> primitiva, <<un sistem circulator>> primitiv si o cooperare metabolica care fac ca fiecare din aceste celule sesile sa reactioneze la mediul sau special, asa încât difera fundamental de o celula planctonica din aceeași specie. Una din consecintele formării biofilmelor cu implicatii medicale, este aceea ca microorganismele componente sunt mult mai rezistente la substante antimicrobiene, ca si la mecanismele imunitare ale gazdei. Ipotezele actuale privind cauzele acestei rezistente a celulelor din biofilme, numita **rezistenta comportamentala, fenotipica sau, mai nou, toleranta**, sunt urmatoarele:

- **aderența la substrat și agregarea bacteriilor între ele;**
- **exopolimerii secretați și care protejează celulele;** această ipoteză, formulată adesea în trecut, conform căreia structura mucoidă ar constitui o barieră de difuzie față de moleculele antimicrobiene, este respinsă azi de către unii autori;
- **enzimele degradative, fie în concentrații mari, fie printr-o activitate concertată, sinergică a celor provenind de la specii diferite ale biofilmului;**
- **adeziunea celulară însăși determină modificări fiziologice care explică fenomenul de rezistență a microorganismelor din biofilme (Nichols, 1989);** astfel, s-a demonstrat pe *E. coli* (Tresse și colab., 1997, citați de Carpentier, 1999) la celulele imobilizate într-un gel de agar (simulare a unui biofilm) o

- subexprimare a porinei **Omp F**, ceea ce ar explica rezistența la antibiotice, pentru că majoritatea antibioticelor hidrofile trebuie să treacă prin această porină pentru a penetra în spațiul periplasmic;
- implantarea și dezvoltarea unui biofilm începând cu adeziunea celulelor sunt procese programate de către genomul bacteriilor care se fixează la substrat, o mare parte din gene (40%) fiind implicate în această nouă programare (ceea ce ar putea permite crearea de noi instrumente moleculare pentru a lupta împotriva biofilmelor nedorite).

Succesul oricărui patogen depinde de capacitatea sa de a "simți" mediul său și ca răspuns, să-și moduleze expresia acelor gene necesare pentru stabilirea în noua nișă. Capacitatea bacteriilor patogene de a supraviețui în diferite medii improprie reliefează importanța înțelegerii de către om a reglării genelor care codifică factorii de virulență, ca și a identificării semnalelor din mediu implicate. Astfel, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (prezentă în diferite medii: sol, ape, dar și pe țesuturi arse, în plămânii pacienților cu infecții pulmonare acute, ca și în infecțiile cronice la pacienții cu fibroză chistică) a fost recent descris un mecanism reglator al exprimării genelor, cunoscut ca *autoinducție* sau «*quorum sensing*». S-a dovedit că mecanismul este utilizat și de alți agenți patogeni ai plantelor și animalelor, fiind aproape ubicvitar la bacteriile Gram negative. Acest sistem permite unei populații bacteriene să-și monitorizeze densitatea, cu scopul de a permite inițierea unor procese dependente de densitate. În al doilea rând, capacitatea bacteriilor de a «percepe» densitatea populației bacteriene și de a răspunde în funcție de aceasta, denumită mecanism de *quorum sensing and response*, poate acționa pentru a asigura la un moment dat producerea unor factori mențiți să contracareze efectorii imunitari ai gazdei. Probabil că dacă celule de *P. aeruginosa* ar fi în organismul gazdă în număr mic și ar iniția sinteza factorilor de virulență de la început, aceștia ar declanșa răspunsul imun al gazdei, și date fiind densitatea celulară mică și, proporțional, concentrația mică a produșilor de virulență, infecția ar fi ușor eliminată. Din contră, dacă producerea factorilor care declanșează răspunsul imun este inițiată când densitatea celulară este mare, infecția poate avea mai multe șanse de a evolua. Gradul mare de corelație între autoinducție și densitatea celulară, dependentă de timp, a condus la adoptarea unei noi terminologii și înlocuirea termenului de autoinducție cu cel de «*quorum sensing*» (Passador și colab., 1995).

La *P. aeruginosa* au fost identificate două sisteme de semnalizare intercelulară: 1) *las R - las I*; 2) *rhl R - rhlI* (denumit și *vsm R - vsm I*). Produsul genei *las I* direcționează sinteza unui semnal extracelular N- butyryl-L-homoserin-lactona, care este necesar pentru activarea genelor de virulență și exprimarea factorului σ de fază staționară RpoS, de către produsul genei *rhlR*. La densități populaționale suficiente, semnalele autoinduse ating concentrații necesare pentru activarea genelor. Acest tip de reglare a genelor a fost denumit *quorum sensing and response* (= răspuns la atingerea unei anumite densități celulare). Recent, acyl-homoserin-lactonele (AHL) au fost detectate în biofilmele formate în mod natural. Deoarece *quorum sensing and response* necesită densități suficiente ale bacteriilor, se consideră că moleculele semnal nu participă la etapele inițiale ale formării biofilmelor – atașare și proliferare, dar pot fi implicate în diferențierea biologică. Inhibarea acestor semnale intercelulare ar putea fi utilă în tratarea eficientă a infecțiilor determinate de biofilme (Davies și colab., 1998).

Deși corpul uman are mecanisme de apărare și deseori se rezolvă problema introducerii unui număr mare de bacterii libere (10^6 celule) în organele sterile (inimă, plămân, peritoneu), mult mai puține (10^3) celule sesile pot cauza infecții persistente în aceleasi organe. În timp ce bacteriile libere care cauzează infecții bacteriene acute diseminate sunt uzual controlate de dozele conventionale de antibiotice, bacteriile din biofilme determină infecții cronice rezistente la chemoterapia cu antibiotice. Semnificația medicală a acestui proces este legată în special de utilizarea în medicină, în diferite scopuri, a biopolimerilor, a caror suprafață poate fi colonizată de bacterii, generatoare a unor infecții asociate utilizării materialelor protetice. Multe corpuri

straine (catetere intravasculare, sonde gastrice si urinare, tuburi de drenaj) si biofilmele bacteriene aderente pot fi indepartate inainte de aparitia infectiei cronice. Daca bacteriile din biofilmele formate au capacitatea de a persista, agregate mari de celule prinse intr-o matrice de glicocalix se pot detasa. Când agregatele bacteriene s-au detasat dintr-un *pace-maker* cardiac implantat pacientilor, celulele grupate in mase mari ajunse in capilarele inguste ale plamânilor si creierului pot produce pneumonie sau congestii.

Deoarece biofilmele protejeaza bacteriile de mecanismele de aparare ale gazdei asa de eficient, trebuie sa fie folosita o stratagema foarte adecvata pentru a evita introducerea biofilmelor in organele sterile. Personalul medical trebuie sa se asigure ca biofilmele din apa, aer, sistem respirator artificial nu se raspândesc in sistemul pulmonar al bolnavilor, generând infectii nosocomiale. Chirurgii trebuie sa se convinga ca nu se implanteaza biofilme cu bacterii vii odata cu materialele straine si ca tesuturile moarte si degradate au fost riguros indepartate. Orice material steril nu trebuie sa poarte reziduuri de biofilme omorâte prin sterilizare, deoarece aceste excrescente duc la accelerarea dezvoltarii secundare a biofilmelor de catre microorganismele libere. O modalitate de preveni infectarea cateterelor este aceea de a depista bolnavii purtatori ai unor tulpini de stafilococi (*S. epidermidis*, producator de biofilme) la nivelul pielii, caci o astfel de colonizare ar putea conduce la dezvoltarea unei infectii legate de cateter.

Procesul de aderenta are efecte care pot fi traduse prin persistenta bacteriilor pe dispozitivele medicale, ca si pe tevil de apa contaminate cu bacterii, chiar atunci când sangele si apa contin suficiente antibiotice, respectiv clor pentru a omorî micropopulatia de celule aflate in stare libera. Apar probleme majore in contextul sanatatii publice, care privesc distributia apei potabile prin conducte pe care se formeaza biofilme de enterobacterii care elibereaza periodic celule, recontaminând apa si sistemele de distributie. In sistemele de distributie a apei, in special in statiile hidrotermice unde apa nu este clorinata si unde se formeaza aerosoli inhalabili (sisteme de aer conditionat, dusuri cu apa fierbinte) poate fi prezenta in biofilme si bacteria *Legionella pneumophila*, agentul patogen al "bolii legionarilor", dotat cu o mare capacitate de aderenta la metale si considerat factor de *biohazard infections* (generator de infectii grave). De asemenea, suprafetele liniilor de productie si ambalare a alimentelor sunt contaminate de biofilme dificil de eliminat, ce pot constitui rezervoare de bacterii potential patogene (enterobacterii, *Listeria sp*).

Când biofilmele din infectiile cronice s-au dezvoltat, introduse sau nu cu implanturile sau organele transplantate, chemoterapia trebuie sa se bazeze pe doze de antibiotice necesare omorârii bacteriilor din biofilme si nu pe cele care pot ucide celulele libere, determinate prin testele de rutina de testare a sensibilitatii bacteriene la antibiotice. Toate antibioticele de pe piata au fost testate si selectate pentru abilitatea lor de a ucide bacteriile planctonice. Industria farmaceutica este preocupata in prezent de programele de dezvoltare a agentilor de penetrare a biofilmelor prin studiul acestora in relatie cu substratul lor natural, sub forma de biofilme sau microcolonii si care sa fie scaldate de un mediu asemanator celui natural (Costerton si colab., 1989; Ceri si colab., 1999).

În mod cert există o asociere între incidența biofilmelor și infecție în anumite boli umane. În fiecare caz, se remarcă o corelație între anumite procese: producerea unei matrice polimerice extracelulare, rezistența fenotipică la agenți antimicrobieni care crește odată cu vârsta biofilmului și rezistența la mecanismele de *clearance* (de neutralizare și îndepărtare a oricărui factor de agresiune) ale sistemului imunitar. În infectiile unor țesuturi și organe altfel sterile (ex. endocardite) biofilmele sunt monoculturi, pe când cele dezvoltate pe suprafața unor țesuturi expuse (nazofaringe, intestin) adesea sunt mixte și, în consecință, mai dificil de tratat.

Infecții umane care implică formarea de biofilme: a) pe țesuturi - endocardita valvulară, otita medie, infectii pulmonare la bolnavii cu fibroza chistică, prostatita bacteriană cronică, periodontita, osteomielita; b) pe dispozitive medicale, cum ar fi valvele cardiace artificiale (protetice), cateterele centrale venoase, cateterele urinare, lentilele de contact, dispozitive intrauterine etc.

Toxinogeneza

Toxinogeneza rezida in capacitatea unor microorganisme patogene de a produce in cursul metabolismului una sau mai multe substante toxice. Descoperirea capacitatii toxigenice i se datoreaza lui Löffler (1884) care, dupa inocularea la soareci de bacili difterici (*Corynebacterium diphtheriae*), a observat aparitia de leziuni in tesuturi indepartate de locul inocularii, deoarece bacteriile se multiplica la poarta de intrare, de unde difuzeaza in organism o substanta cu efect toxic. Uneori bacteriile nu produc neaparat o toxina, dar efectele se datoreaza altor produsi de metabolism sau efectiv cresterii numarului de bacterii. Toxinele sunt otravuri microbiene care afecteaza profund initierea si evolutia unei infectii, deoarece o singura toxina poate face ca un microorganism sa fie virulent.

Toxinele bacteriene produse *in vitro* pot fi injectate la animale si reproduc manifestarile patologice ale infectiei si efecte letale. Nu numai bacteriile patogene produc toxine, ci si bacteriile saprotofe (*Clostridium botulinum*).

Pentru ca efectul toxic sa se produca, toxinele trebuie sa fie eliberate din celule si sa fie solubile in umorile organismului. Dupa ce toxinele sunt sintetizate in celulele bacteriene, pot fi eliberate din celule in mediul extracelular sau ramân in celulele bacteriene, fiind eliminate dupa autoliza acestora, astfel ca se clasifica in **exotoxine** si **endotoxine**. Dupa compozitia chimica, toxinele pot fi de natura proteica (exotoxine) sau lipoproteica, lipopolizaharidice (endotoxine). Principalele caracteristici ale acestor categorii de toxine bacteriene sunt prezentate in tabelul nr.3.

Tabel nr. 3. Trasaturile principale prezentate comparativ ale exotoxinelor si endotoxinelor bacteriene.

Proprietatea	Exotoxine	Endotoxine
Sursa	Anumite specii ale bacteriilor Gram pozitive si Gram negative	Peretele celular al majoritatii bacteriilor Gram negative
Secretate de celule	Da	Nu
Structura chimica	Poliptide	Lipopolizaharide
Localizarea genelor	Plasmide sau bacteriofagi	Cromosomul bacterian
Toxicitate	Mare (doza letala este de ordinul a 1 µg)	Redusa (doza letala este de ordinul a sute de µg)
Efecte clinice	Diferite efecte	Febra, stare de soc
Modul de actiune	Diferite moduri	Prin intermediul TNF si interleukina-1
Antigenitate	Induc titruri mari de anticorpi numiti antitoxine	Slab antigenice
Vaccinuri	Pot fi transformate in toxoizi (anatoxine), folositi ca vaccinuri	Nu pot fi transformate in toxoizi si nu exista alte vaccinuri disponibile
Termostabilitate	Distruse rapid la 60°C (cu exceptia enterotoxinei stafilococice)	Stabile la 100°C timp de 1h
Boli tipice	Tetanos, botulism, difterie etc.	Meningocemie, infectii cu bacili Gram negativi

Exotoxinele sunt eliberate în mediu (gr. *exo* = în afara), se dizolvă în sânge și circula în organism, ajungând la situsul lor de acțiune, ceea ce determină apariția manifestărilor caracteristice bolii. Sunt produse în cea mai mare parte de către bacteriile patogene Gram pozitive, deși și unele bacterii Gram negative au această capacitate, cum ar fi: *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Exotoxinele sunt produse *in vivo* la locul multiplicării bacteriilor și transportate la distanță, exercitându-și efectul asupra țesuturilor sensibile ale organismului gazdă. Eliberarea din celulele producătoare are loc în faza de multiplicare activă a celulelor, iar concentrația lor în mediu este maximă când creșterea bacteriană a atins punctul maxim. Pot rămâne parțial legate de corpii celulari (de ex. la *Corynebacterium diphtheriae*, *Clostridium botulinum* toxina este eliberată total doar după liza celulelor). Toxicitatea se apreciază prin DL50 (Doza letală 50). De exemplu :

DL50 = 0,002 ml filtrat de toxina difterică ;

= 0,005 ml " " tetanică ;

= 0,0001 ml " " botulinică ;

Toxinele purificate au o toxicitate mult mai mare, comparativ cu cea a filtratelor culturilor. Deoarece exotoxinele sunt proteine, moleculele lor sunt sensibile la căldură și la substanțe chimice care reacționează în mod normal cu proteinele. De exemplu, toxinele supuse acțiunii formaldehidei își pierd toxicitatea, transformându-se în *anatoxine* sau *toxozizi* care își păstrează însă capacitatea de a declanșa un răspuns imun dacă sunt introduse într-un organism imunocompetent. Exploatarea acestor proprietăți conduce la obținerea anatoxinelor difterice și tetanice utilizate în imunizarea activă antidifterică și respectiv antitetanică. Sunt sensibile la pH acid și pot fi neutralizate de anticorpi specifici. Fiind de natură proteică, multe pot fi inactivate sau chiar distruse de enzimele proteolitice intestinale. Face excepție toxina botulinică, a cărei toxicitate se intensifică după o proteoliză limitată, prin expunerea unor grupări de toxicitate anterior mascate.

Din punct de vedere structural sunt similare hormonilor glicoproteici, fiind alcătuite din 2 subunități polipeptidice A și B, una având activitate biologică, cealaltă mediind legarea moleculelor toxinei de celulele sensibile. Uneori, în forma nativă au structura unui singur lanț, dar în timpul eliminării din celulă producătoare sau în mediul extracelular, sub acțiunea unor enzime bacteriene sau ale gazdei (proteaze), lanțul inițial este scindat în cele două lanțuri. Efectul toxic se poate manifesta fie la nivelul membranei celulelor sensibile (fosfolipaze, hemolizine, lizine care degradează lipidele membranare), fie la nivelul unor ținte intracelulare.

Pentru a-si exercita efectul biologic, toxinele trebuie sa se lege de receptori celulari, dupa care sunt internalizate si actioneaza la nivelul tinte intracelulare.

In cazul mai multor boli de etiologie bacteriana, semnele si simptomele acestora sunt efectele toxinelor elaborate de agentii lor cauzali. In tabelul nr. 4 sunt prezentate patogenitatea si modul de actiune ale celor mai importante exotoxine, eliberate atat de bacterii Gram pozitive, cat si de bacterii Gram negative.

Tabel nr. 4. Patogenitatea si modul de actiune ale celor mai importante exotoxine.

Specii bacteriene	Boala	Modul de actiune	Vaccin disponibil de tip toxoid
Gram pozitive			
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difterie	Inactiveaza EF-2 prin ADP-ribozilare	Da
<i>Clostridium tetani</i>	Tetanos	Blocheaza eliberarea glicinei - neurotransmitator inhibitor	Da
<i>C. botulinum</i>	Botulism	Blocheaza eliberarea acetilcolinei	Da
<i>C. difficile</i>	Colita pseudo-membranoasa	Exotoxina B este toxica pentru enterocite	Nu
<i>C. perfringens</i>	Gangrena gazoasa	Alfa toxina este o lecitinaza. Enterotoxina este un superantigen	Nu
<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax	Una dintre toxine este o adenilat ciclaza	Nu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Soc toxic	Toxina este un superantigen; se leaga de moleculele CMH clasa II si de receptorul T celular (TCR); induce sinteza IL-1 si IL-2	Nu
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Scarlatina	Este un superantigen; actioneaza similar toxinei TSST-1 produsa de <i>S. aureus</i>	Nu
Gram negative			
<i>Escherichia coli</i>	1. Diaree apoasa	Toxina labila stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare; toxina stabila stimuleaza guanilat ciclaza.	Nu
	2. Diaree sanguinolenta	Verotoxina este citotoxica pentru enterocite	Nu
<i>Vibrio cholerae</i>	Holera	Stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare	Nu
<i>Bordetella pertussis</i>	Tuse convulsiva	Stimuleaza adenilat ciclaza prin ADP-ribozilare; inhiba chemokin-receptorul	Da

Tetanosul este datorat efectelor sistemice ale *tetanospasminei*, toxina codificata de o plasmida. Toxina este produsa si eliberata prin liza celulelor de *Clostridium tetani* dupa cresterea in conditii anaerobe, atat *in vitro* cat si *in vivo*, cum ar fi de exemplu in rani profunde produse prin intepare. Toxina este produsa initial ca un singur lant polipeptidic de 160 kDa. La eliberarea din celula bacteriana, peptidul este clivat de enzime proteolitice in doua lanturi polipeptidice,

conectate de o punte disulfidică ($-S-S-$). În condiții reducătoare, se desface această legătură și rezultă două lanțuri: lanțul greu (β) – de 107 kDa și lanțul ușor (α) – de 53 kDa. Situl moleculei de toxină prin care se leagă de receptori specifici este situat pe lanțul β . Acest polipeptid se leagă de gangliozele din membrana neuronului. Lanțul α este internalizat și se deplasează de la nervii periferici spre sistemul nervos central (SNC). Lanțul ușor este o protează care degradează proteina responsabilă de eliberarea neurotransmițătorilor inhibitori.

Mecanism de acțiune al toxinei tetanice. Toxina tetanică este deci o neurotoxină care împiedică eliberarea neurotransmițătorilor inhibitori. Toxina eliberată la nivelul unei plăgi periferice, poate circula fie prin transport axonal retrograd, fie prin torrentul circulator, la cornul anterior și neuronii interstitali ai măduvei spinării. La nivelul SNC (măduva spinării, cerebel), tetanospasmina se leagă repede de receptorul specific, o ganglioza care conține acid stearic, sfingozină, glucoză, galactoză, N-acetilglucozamină și acid N-acetilneuraminic (acid sialic).

Efectul spasmogen al toxinei se datorează acțiunii sale asupra componentelor presinaptice ale arcurilor reflexe din măduva spinării. Toxina blochează inhibiția normală postsinaptică a neuronilor spinali motori, care urmează după impulsurile aferente, prin prevenirea eliberării neurotransmițătorilor inhibitori (acid γ -aminobutiric, glicină). Blocarea eliberării acestor neurotransmițători conduce la o sensibilitate mare la impulsurile excitatorii, necontrolate de mecanismele inhibitorii și la contractii spastice ale mușchilor voluntari (scheletici), exemplificate cel mai bine de spasmul mușchilor maxilarelor, gâtului și paralizie spastică generalizată, caracteristică tetanosului.

Botulismul este o intoxicație alimentară, consecință a ingerării toxinelor produse de *Clostridium botulinum*, care se dezvoltă în alimente, principalele vehicule fiind fructele și legumele conservate incorect (de obicei pregătite în casă), condimente și produse de peste.

Contaminarea plăgilor cu agentul patogen determină o infecție neinvazivă și formarea de toxină, care caracterizează *botulismul de ranire*.

C. botulinum poate de asemenea să colonizeze tractul intestinal al copiilor și să producă toxină *in situ*, ceea ce conduce la starea de *botulism infantil*.

Toxina se acumulează în celulele bacteriene în timpul germinării sporilor și creșterii active a celulelor vegetative, dar este eliberată numai după liza celulelor. Fiecare din cele 7 tipuri serologice de *C. botulinum* (A, B, C- α , D, E, F, G) produce câte o toxină specifică de tip. Unele sunt codificate de o plasmidă, altele de un bacteriofag temperat și altele de gene cromozomale.

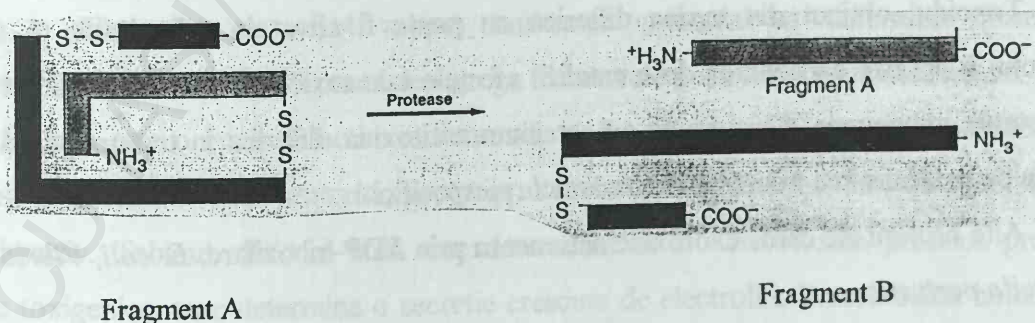
Toxinele produse de serotipurile A, B, E si F afecteaza omul. Toxinele botulinice sunt produse ca o proteina progenitor cu g.m. ~ 150 kDa, ca molecule inerte care devin active dupa proteoliza, dar clivajul proteic are loc la nivelul unor situsuri localizate intern in moleculele peptidice, astfel ca toxina nu isi schimba greutatea moleculara dupa activare.

Toxina este compusa din doua polipeptide mentinute impreuna de o punte disulfidica. Una din subunitati se leaga de un receptor de pe suprafata neuronului; cealalta subunitate este o proteaza care degradeaza proteinele responsabile de eliberarea acetilcolinei.

Mecanism de actiune al toxinei botulinice. Toxina botulinica este o neurotoxina care blocheaza eliberarea acetilcolinei la nivelul sinapselor, determinând o paralizie flasca. Este unul dintre cei mai toxici compusi de natura biologica cunoscuti. Dupa absorbtia la nivelul tractului gastrointestinal, toxina ajunge pe cale sanguina la neuronii senzitivi (la jonctiunile neuromusculare si sinapsele periferice autonome), unde se leaga de componentele presinaptice, blocând eliberarea acetilcolinei din terminatiile nervoase motoare colinergice. Simptome: slabiciune, tulburari de echilibru, greata, tulburari de vedere si de vorbire, dilatarea pupilelor, retentie urinara, paralizie generalizata flasca a muschilor scheletici si paralizia muschilor respiratori.

Difteria. Toxina produsa de *Corynebacterium diphtheriae*, agentul patogen al difteriei, este codificata de gena structurala *tox*, parte a unui genom fagic (corinefagul β). Doar tulpinile lizogene de bacil difteric sunt producatoare de toxina difterica. Toxina este secretata sub forma unui peptid unic, cu g.m. 62.000 Da. Prin proteoliza blânda, peptidul unic este scindat in doua lanturi majore A si B, conectate prin puncti disulfidice (fig. 9).

Fig. 9. Structura si mecanismul de activare al exotoxinei difterice; toxina extracelulara intacta se leaga de celula eucariota prin intermediul fragmentului B, iar dupa clivajul proteolitic si reducerea legaturii disulfidice, fragmentul A care contine enzima de ribozilare este activat.



Mecanismul de actiune al toxinei difterice. Peptidul A contine situsul activ al enzimei, cu efect de inhibare a proteosintezei. Peptidul B este responsabil pentru legarea moleculelor de toxina de receptorul lor specific situat pe celulelor epiteliale ale tractului respirator superior. La legarea de celulele -tinta, punctile disulfidice sunt reduse si peptidul A (g.m. = 22 kDa) intra in celula. Acest fragmentul A de la capatul NH₂ – terminal al exotoxinei este o enzima care catalizeaza transferul ADP-ribozei de la NAD (nicotinamid adenin-dinucleotid) la EF-2, dupa reactia:



Inhibarea proteosintezei este un efect al adenoribozilarii si inactivarii consecutive sub actiunea peptidului A, a factorului de elongatie – 2 (EF - 2), enzima necesara pentru translocarea polipeptidil – ARNt, de la situsul acceptor la situsul donor al ribozomilor de tip eucariot. Prin ADP-ribozilarea acestui factor EF-2 si inactivarea sa consecutiva, este blocata translocatia si procesul de proteosinteza inceteaza. Activitatea enzimatica a toxinei difterice (fragmentul A) este specifica pentru acest factor. Specificitatea se datoreaza prezentei in EF-2 a unui aminoacid unic, o histidina modificata, numita *diftamida*. Reactia are loc in toate celulele eucariote, fara specificitate de tesut sau organ. In celulele procariote si la nivelul mitocondriilor proteosinteza nu este afectata, deoarece este implicat un factor de elongatie diferit, insensibil. Actiunea enzimei este foarte puternica, astfel ca o singura molecula de fragment A poate omori o celula in câteva ore.

Fragmentul B , un peptid cu g.m. 40.000 Da, de la capatul COOH-terminal se leaga de receptorii de pe membrana celulelor eucariote si mediaza transportul transmembrantar al fragmentului A in celule, unde are loc proteoliza localizata si reducerea punctii disulfidice, cu elibereaza fragmentul A, care are activitate enzimatica ce conduce la inactivarea EF-2.

Celulele moarte si dezintegrate se acumuleaza, impreuna cu mucus, bacterii, leucocite, material fibros, si determina blocarea cailor respiratorii.

Toxoidul obtinut din toxina difterica nu poate fi clivat in subunitatile A si B, deci toxoidului îi lipseste capacitatea de a cataliza efectele sale toxice intracelulare, dar isi pastreaza proprietatile imunogene. Seroterapia cu ser imun antitoxina difterica in tratamentul difteriei, se bazeaza pe neutralizarea toxinei de catre anticorpii specifici.

Alte bacterii ale caror exotoxine actioneaza prin ADP–ribozilare: *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Bordetella pertussis*.

Celule de *C. diphtheriae* nelizogene pot fi prezente in microbiota orofaringelui persoanelor sanatoase, insa doar tulpinile de *C. diphtheriae* lizogenizate de un bacteriofag temperat pot fi agenti cauzali ai difteriei. Sinteza exotoxinei la tulpinile lizogene este controlata prin interactiunea fierului din mediu cu represorul genei *tox*, sintetizat de bacterie. La cresterea concentratiei de Fe, represorul inhiba transcrierea genei *tox*.

Toxina difterica este absorbita in vasele limfatice si sanguine si exercita câteva efecte si semne clinice :

- Stare generală proasta, cu febra, paloare, epuizare ;
- Miocardita, de obicei in primele 2 saptamâni, modificari electrocardiografice si posibil stop cardiac ; daca infectia nu are sfârșit letal, de obicei vindecarea este completa ;
- Polinevrita, care poate surveni dupa boala ca rezultat al demielinizarii ; aceasta poate afecta, de ex., perechea a IX-a de nervi cranieni, având ca efect paralizia palatului moale si regurgitarea lichidelor.

Gangrena gazoasa. *C. perfringens* si alte specii de clostridii produc numeroase toxine care determina gangrena gazoasa. Un total de sapte factori letali si cinci enzime au fost caracterizate, dar nici o specie de *Clostridium* nu produce toti cei 12 metaboliti. Cel mai bine caracterizata este α - toxina care este o lecitinaza care hidrolizeaza lecitina din membrana celulara, determinând distrugerea membranei si moartea celulei. Celelalte patru enzime sunt collagenaza, proteaza, hialuronidaza si DN-aza. Cele sapte toxine letale formeaza un grup heterogen cu activitate hemolitica si necrotica. Anumite tulpini de *C perfringens* produc o enterotoxina care determina diareea. Aceasta enterotoxina actioneaza ca un superantigen, similar enterotoxinei produsa de *S. aureus*.

C. difficile produce doua exotoxine, ambele fiind implicate in patogeneza colitei pseudomembranoase. Exotoxina A este o enterotoxina care determina diareea apoasa. Exotoxina B este o citotoxina cu efect asupra mucoasei colonului si determina formarea de pseudomembrane. Exotoxina B poate dezagrega filamentele de actina ale citoscheletului.

Holera este o boala infectioasa determinata de *Vibrio cholerae*. Se caracterizeaza prin semne si simptome de gastroenterita, prototip al sindroamelor diareice, fara ca agentul patogen sa fie invaziv. Tabloul clinic al bolii este determinat de o enterotoxina proteica produsa de tulpinile toxigenice, care determina o secretie crescuta de electroliti. Enterotoxina holerica are o

g.m. de 84 kDa, o subunitate B compusa din 5 monomeri identici (fiecare cu g.m. 11.500 Da) si o subunitate activa A (g.m. 27 kDa).

Modul de actiune al toxinei holerice. Toxina se leaga la receptorul glicoproteic GM_1 de pe membrana celulelor epiteliale intestinale si activeaza adenilat-ciclaza, ceea ce determina nivele crescute de AMPc si o hipersecretie de electroliti (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) si apa. Aceste modificari se manifesta clinic printr-o diaree cu aspect caracteristic holerei, numit "apa de orez".

Alte exotoxine sunt produse de stafilococi, streptococi, bacilul antraxului, bacilul pertussis. De exemplu, toxinele produse de *Staphylococcus aureus* produc leziuni ale membranelor celulare ale gazdei si pot avea o activitate generala sau foarte specifica:

Toxina α formeaza pori sau canale transmembranare la multe tipuri de celule. Canalele constau in inele hexamerice de unitati de toxina (34 kDa), care altereaza permeabilitatea celulei gazda, determinând citoliza. In functie de doza de toxina si calea de patrundere in gazda, aceasta toxina poate cauza fenomene de paralizie, neurotoxicitate, necroza si moarte. Este eliberata de bacteriile aflate in faza exponentiala de crestere. Exprimarea genei care codifica aceasta toxina, *hly*, se afla sub controlul genei *agr* (*accessory gene regulator*; este notata si *exp*), care controleaza exprimarea unui numar de proteine extracelulare, incluzând: toxina exfoliativa, TSST (*toxic shock syndrome toxin*), toxinele α , β si δ , enterotoxina b, lipaze si nucleaze.

Toxina β are o activitate mai restrictiva. Este o fosfolipaza care ataca sfigomieline din membrana celulara a eritrocitelor, macrofagelor si plachetelor sanguine. Exprimarea acestei toxine este controlata de prezenta unui bacteriofag in genomul stafilococilor. In acest proces sunt implicati doi fagi diferiti; se considera ca acestia stopeaza sinteza de toxina β , fie prin insertie in gena care codifica toxina, *hlyB*, fie prin codificarea unor molecule represor ale acestei gene. Unul dintre acesti fagi contine o gena care codifica stafilokinaza; deci când gena pentru toxina β este inactiva (*switched off*), gena pentru stafilokinaza este activa (*switched on*).

Toxinele γ si δ sunt active de asemenea pe membranele celulelor gazda. Toxina γ este compusa din doua lanturi (de 32 si 36 kDa), dar mecanismul sau de actiune este necunoscut. Toxina δ este o molecula mult mai mica (3 kDa) care lizeaza mai multe tipuri de celule prin solubilizarea lipidelor membranare, intr-o maniera asemanatoare unui detergent.

Leucocidina este o toxina produsa de *S. aureus* activa in special asupra leucocitelor PMN si macrofagelor. Aceasta toxina are doua componente: F si S. Legarea componentului S de gangliozida GM_1 , este urmata de legarea componentului F, ceea ce conduce la o crestere

irreversibila a activitatii enzimatice a acyl-fosfatazei membranare si la activarea fosfolipazei 2 a celulei gazda. Rezultanta finala este liza celulei gazda.

TSST. Toxina care determina sindromul de soc toxic - *Toxic Shock Syndrome Toxin* (TSST) este considerata un superantigen produs in primul rând de anumite tulpini de *Staphylococcus aureus* (dar si de anumite tulpini de *Streptococcus pyogenes*), Spre deosebire de antigenele obisnuite care activeaza una – câteva limfocite Th, TSST activeaza un mare numar de limfocite Th. Aceasta toxina se leaga direct de moleculele CMH clasa II, fara a mai fi internalizata si prelucrata. Acest complex interactioneaza cu lantul β al receptorului Tcelular ($V\beta$ al TCR) al multor celule Th, determinând activarea lor si eliberarea consecutiva unor mari cantitati a IL-2, ca si a IL-1 din macrofage. Aceste interleukine sunt responsabile de multe dintre simptomele socului toxic. TSST este de asemenea un mitogen al limfocitelor T, ceea ce determina o supraproductie de citokine. Enterotoxina stafilococica, care determina toxiinfectie alimentara, are un mod similar de actiune, dar actioneaza local la nivelul tractului intestinal si cauzeaza voma si diaree.

Toxina eritrogena produsa de *Streptococcus pyogenes*, are un mecanism de actiune similar cu cel al TSST, actionând ca un superantigen. Genele care codifica aceasta toxina apartin unui bacteriofag temperat. Tulpinile bacteriene nelizogene nu pot determina scarlatina, dar pot fi agent cauzal al faringitelor si amigdalitelor.

Antraxul. *Bacillus anthracis* (agentul patogen al antraxului) produce o toxina cu trei componente: factorul "edem", antigenul protector si factorul letal. Factorul "edem" este o adenilat-ciclaza care necesita factor protector pentru a patrunde in celulele umane. Adenilat-ciclaza bacteriana creste concentratia de AMPc in celula, determinând pierderea ionilor de clor si a apei si aparitia edemului in tesuturi. Factorul letal este o proteaza care cliveaza o fosfokinaza necesara pentru transmiterea semnalului in calea care controleaza cresterea celulara. Pierderea fosfokinazei conduce la inhibarea cresterii celulare si moartea celulara consecutiva.

Tusea convulsiva. *PT (pertussis toxin)* – o toxina termolabila, care determina dermatonecroza la cobai si iepure. Aceasta toxina poate inhiba anumite functii fagocitare si poate contribui astfel la supravietuirea intracelulara a bacteriilor.

Mecanismele de actiune de baza ale exotoxinelor bacteriene sunt prezentate sintetic in tabelul nr. 5.

Tabel nr. 5. Mecanisme de actiune ale exotoxinelor bacteriene.

Mecanism de actiune	Exotoxina
ADP- ribozilare	Toxina difterica, toxina holerica, toxina termolabila produsa de <i>E. coli</i> , toxina pertussis
Superantigene	Toxina sindromului de soc toxic, enterotoxina stafilococica, toxina eritrogena streptococica
Proteaze	Toxina tetanica, toxina botulinica
Lecitinaza	α - toxina produsa de <i>C. perfringens</i>

*

Când toxinele sunt produse si actioneaza intr-un organism, pot manifesta *histotropism*; de ex. toxina botulinica este numita neurotoxina datorita actiunii sale asupra sistemului nervos, in timp ce toxina stafilococica este numita enterotoxina datorita actiunii sale asupra tractului gastrointestinal.

Organismul raspunde la exotoxine prin producerea unor anticorpi numiti antitoxine. Combinarea moleculelor de toxine cu antitoxinele are ca efect neutralizarea toxinelor. Terapia botulismului, tetanosului sau difteriei include seroterapia cu antitoxine. Prevenirea unor infectii cu bacterii Gram pozitive se bazeaza pe utilizarea anatoxinelor, ca vaccinuri eficiente

Deoarece exotoxinele sunt proteine, moleculele lor sunt sensibile la caldura si la substante chimice care reactioneaza in mod normal cu proteinele. De exemplu, toxinele supuse actiunii formaldehidei isi pierd toxicitatea, pastrându-si insa capacitatea de a declansa un raspuns imun daca sunt introduse intr-un organism imunocompetent.

Endotoxinele si lipopolizaharidele (LPS)

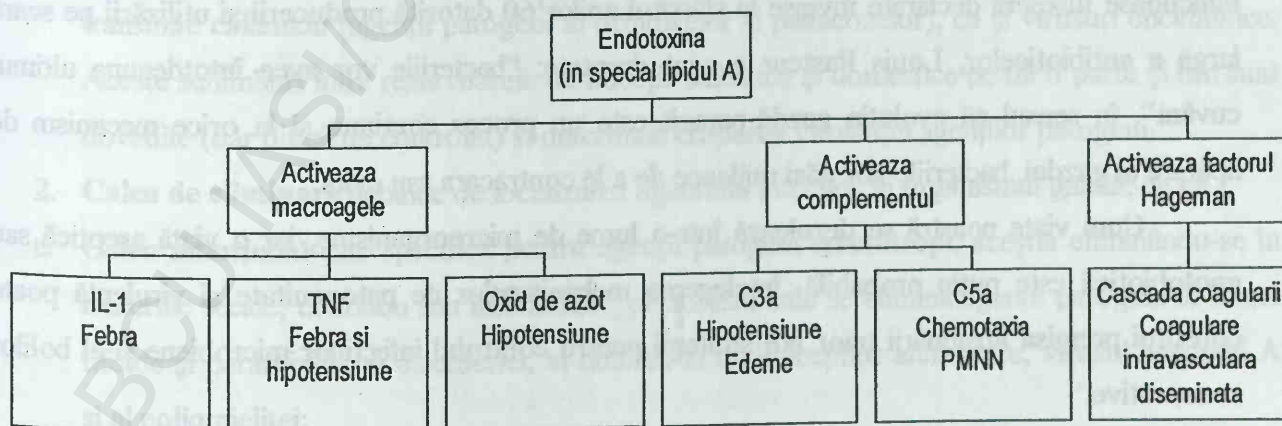
Componentul major al peretelui celular al bacteriilor Gram negative, lipopolizaharidele (LPS) sunt eliberate numai dupa dezintegrarea celulelor; sunt complexe lipo-polizaharid-proteice. Au o serie de activitati similare peptidoglicanului; de asemenea, pot avea efect letal. Nu stimuleaza raspunsul imun si nu pot fi transformate in toxoizi. LPS pot afecta orice raspuns inflamator sau alt mecanism de aparare al gazdei. Endotoxinele isi manifesta prezenta prin câteva simptome: febra, stare de slabiciune a organismului, dureri si stare generala alterata. In aceste conditii se pot instala tulburari ale sistemului circulator si starea de soc. Permeabilitatea vaselor de sânge se modifica, plasma se extravazeaza in spatiile intercelulare, tesuturile se tumefiaza, presiunea sanguina creste si pacientul poate intra in coma. Aceasta conditie, numita soc endotoxic, se poate instala si in cursul antibioterapiei unei infectii cu bacterii Gram negative,

datorită eliberării masive de endotoxine în cursul dezintegrării celulelor moarte. Mortalitatea prin șocul endotoxic, indus de prezența endotoxinelor în circulație este de ordinul 20 - 70%. Două din sursele majore ale endotoxinei sunt infecția sângelui cu bacterii Gram negative (septicemia) și pătrunderea bacteriilor din microbiota intestinală datorită unei leziuni a mucoasei respective. Toxicitatea este în mare măsură determinată de interferența cu sistemele de apărare nespecifice și specifice ale gazdei.

Termenii de endotoxină și LPS sunt frecvent utilizați ca sinonime; totuși termenul de LPS trebuie utilizat doar pentru moleculele de LPS purificate, iar termenul de endotoxină pentru LPS și eventualele proteine asociate, derivate din membrana externă, eliberate de pe suprafața celulară. Termenul de endotoxină, însemnând toxina bacteriană asociată, a fost inițial utilizat pentru a distinge endotoxinele de toxinele proteice (exotoxine).

Șocul endotoxic este o manifestare potențial letală a infecțiilor cu bacterii Gram negative, inclusiv cu enterobacterii. Endotoxina este un complex farmacologic activ, reprezentat de lipopolizaharidele (LPS) conținute în peretele celular al bacteriilor Gram negative. LPS sunt tristratificate, stratul extern fiind constituit din hidrați de carbon variabili ca structură, care determină specificitatea antigenică (Ag O), extremă în cazul genului *Salmonella* (peste 2000 serotipuri). Stratul median este un miez polizaharidic asemănător la diferite specii, iar stratul intern are o structură înalt conservată, fiind reprezentat de lipidul A. Efectele biologice ale LPS au fost demonstrate experimental injectând i.v. mici cantități la animale, la care determină febră, leucopenie, hemoragii capilare, hipotensiune, colaps circulator, simptome care sunt în mare măsură aceleași cu cele observate la pacienții cu infecții septicemice cu bacterii Gram negative. Modul de acțiune al endotoxinei este schematizat în fig. 10.

Fig. 10. Modul de acțiune al endotoxinei produsă de bacteriile Gram negative, cea mai importantă cauză a șocului endotoxic caracterizat în special prin febră, hipotensiune și coagulare intravasculară diseminată.



Testul cu lizat de limulus (care utilizează un reactiv preparat din amibocite ale crabului în formă de potcoavă – *Limulus polyphemus*), a fost folosit cu rezultate variabile în diagnosticul șocului endotoxic. Lizatul suferă un proces de gelificare când vine în contact cu cantități foarte mici, chiar urme de endotoxină.

Mai promițătoare în diagnosticul șocului septic cu Gram – negativi este utilizarea anticorpilor monoclonali, în tehnica ELISA sau alte tehnici, prin care se poate detecta lipidul A, pentru că efectele farmacologice ale endotoxinei sunt atribuite în primul rând lipidului A, care este puternic antigenic și are determinanți comuni tuturor tulpinilor de bacili Gram negativi. Astfel detectarea lipidului A circulant la pacienții cu septicemie cu Gram negativi poate stabili diagnosticul și o terapie presuntivă poate fi începută înainte ca agentul determinant al infecției să fie izolat și identificat.

*

Numeroase gene pentru produși bacterieni responsabili de virulență sunt localizate frecvent pe plasmide, deși plasmidele înseși nu sunt factori de virulență. De asemenea, plasmidele R, care conțin gene care conferă rezistență la antibiotice, pot fi considerate gene de virulență, deoarece dobândirea rezistenței la agenți antibacterieni determină creșterea incidenței și răspândirea continuă a infecțiilor bacteriene.

Se considera în trecut, în mod greșit, că pentru a controla bolile infecțioase este necesară descoperirea de noi antibiotice și noi vaccinuri. Deși sunt importante și aceste mijloace de luptă împotriva infecțiilor, ele nu au un rol decisiv. De exemplu, de aproximativ două decenii nu s-a mai descoperit o clasa nouă de antibiotice. Dar există în prezent mijloacele necesare pentru a înțelege factorii fundamentali utilizați de către microorganisme pentru a determina infecția și boala. Stanley Falkow – specialist reputat în domeniul mecanismelor de patogenitate și virulență, ca și al variației antigenice a făcut relativ recent următoarea afirmație (1999): “Deși bolile infecțioase fuseseră declarate învinse la sfârșitul anilor ’60 datorită producerii și utilizării pe scară largă a antibioticelor, Louis Pasteur a avut dreptate: “bacteriile vor avea întotdeauna ultimul cuvânt”, în sensul că evoluția gazdă-parazit este un proces continuu și la orice mecanism de apărare al gazdei, bacteriile vor găsi mijloace de a le contracara sau evita.

Cum viața noastră se derulează într-o lume de microorganisme, iar o viață aseptică sau gnotobiotică este puțin probabilă, înțelegerea mecanismelor de patogenitate și virulență poate constitui premisa imaginării unor noi strategii pentru controlul infecțiilor microbiene și al bolilor consecutive.

Condițiile de apariție ale procesului infecțios și clasificarea infecțiilor

Procesul infecțios (lat. *infectio* = a otrăvi, a deteriora) este determinat de capacitatea agentului patogen de a se localiza și multiplica în organism, asigurând stabilirea în organismul gazdă prin colonizarea tranzitorie sau de durată, ca și transmiterea la o nouă gazdă sensibilă. Infecția poate fi inaparentă sau manifestă, în acest caz având o evoluție asociată cu perturbarea stării normale de sănătate a organismului-gazdă și cu fenomene de disconfort, boala infecțioasă având de multe ori un tablou clinic caracteristic.

Pentru apariția unui proces infecțios sunt necesare anumite condiții:

1. Izvorul de infecție generator de agenți infecțioși;
2. Calea de eliminare a agentului infecțios;
3. Calea de transmitere de la izvor la un organism sensibil;
4. Poarta de intrare a agentului infecțios în organismul sensibil.

1. Izvorul de infecție generator de agenți infecțioși

Mediul extern este nefavorabil dezvoltării majorității microorganismelor patogene și menținerii infecțiozității virusurilor. Agenții infecțioși se pot răspândi pe diferite căi (aer, apă, alimente, om bolnav), infectând diferite gazde și generând:

- Zoonoze (infecții ale animalelor);
- Antropozoonoze (infecții ale animalelor, transmise accidental omului: bruceloza, ciurma);
- Antroponoze (infecții prezente numai la om; ex: boli virale ca variola, varicela, oreionul, poliomielita, guturaiul, hepatitele; boli cu etiologie bacteriană ca dizenteria, febra tifoidă, febra paratifoidă, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra);

Agenții infecțioși sunt răspândiți de purtători umani, ca și de către animale sălbatice și domestice, cum ar fi de ex.: câinele transmite virusul rabic, bovinele pot transmite salmonela, ca și bacilul Koch, ovinele pot transmite rickettsii, șoarecii transmit leptospire, păsările pot transmite chlamidii (agenții patogeni ai ornitozelor și psitacozelor), ca și virusuri encefalitice. Aceste schimburi între rezervoarele de infecție sălbatice și domestice pe de o parte și om sunt dovedite (dar dificil de controlat) și determină creșterea virulenței agenților patogeni.

2. Calea de eliminare depinde de localizarea agentului infecțios în organismul gazdă; de ex.:

- *Calea intestinală* este specifică pentru agenții patogeni enterotropi, aceștia eliminându-se în materiile fecale, continuu sau intermitent; pe această cale se elimină agenții patogeni ai febrei tifoide și paratifoide, ai dizenteriei, ai holerei, ai toxiiinfecțiilor alimentare, virusul hepatitei A și al poliomielitei;

- **Calea respiratorie** (prin intermediul picăturilor Pflugge, formate în cursul actelor fiziologice de vorbit, strănut, tuse și în care agenții infecțioși sunt protejați de glicoproteinele salivare) este specifică unor agenți patogeni, cum ar fi: bacilul difteric, agentul patogen al tusei convulsive, agenții patogeni ai rujeolei, varicelei, oreionului, gripei, guturaiului;
- **Soluțiile de continuitate** (răni deschise, care creează continuitate între mediul extern și cel intern al organismului gazdă) – pe această cale se pot transmite agenții patogeni ai stafilocociilor cutanate, ai gangrenei gazoase;
- **Calea urinară** – pe această cale se pot transmite agenții patogeni ai febrei tifoide, ai leptospirozei, ai febrei Q, ai tuberculozei renale;
- **Secreția lactată** poate transmite agenții patogeni ai febrei Q (*Coxiella burnetti*), ai tuberculozei, ai brucelozei;
- În infecțiile generalizate, care nu au poartă de eliminare, agenții patogeni pot părăsi organismul gazdei prin intermediul unui *vector hematofag*. Infecții transmise pe această cale: tifosul exantematic (*Rickettsia prowazekii*), ciurma (*Yersinia pestis*), paludismul (*Plasmodium malariae*), encefalitele virale;
- **Instrumentele medicale** (mai ales cele chirurgicale incorect sterilizate) pot transmite agenții patogeni ai unor infecții, cum ar fi: hepatita B (HBV), sifilisul (*Treponema pallidum*), SIDA (HIV).

3. Calea de transmitere.

Agenții patogeni se transmit de la izvorul de infecție, la o gazdă receptivă, prin:

- contact direct – între organismul infectant și receptor există o legătură directă: prin contact sexual (hepatita B, sifilis, gonoree, SIDA), prin mușcătură (rabie), prin supt (febra Q, tuberculoza – la om și animale), prin sărut (TBC pulmonar, sifilis, mononucleoza infecțioasă numită și boala sărutului), prin contact cutanat (dermatomicoze, furunculoza);
- indirect, prin intermediul aerului, apei, solului (+praf), obiectelor (inclusiv instrumente medicale) și alimentelor *contaminate* (numite *vehicule* pentru că vehiculează agenții infecțioși).

4. Poarta de intrare. Pentru a putea intra în organism, agenții infecțioși trebuie să învingă barierele naturale. Poarta de intrare trebuie să corespundă căii prin care s-a făcut eliminarea agentului patogen:

- pe cale digestivă pătrund agenții patogeni ai hepatitei A (digestive), febrei tifoide, dizenteriei, holerei, febrei Q, toxinfecțiilor alimentare, enterovirozelor;
- pe cale respiratorie pătrund agenții patogeni ai: oreionului, guturaiului, gripei, rujeolei, variolei, varicelei, tusei convulsive;
- pe cale cutanată pătrund (prin leziuni, mai dificil prin tegumentul intact): agenții patogeni ai antraxului, febrei Q, turbării, sifilisului.

Există microorganisme care pot pătrunde pe mai multe căi (principale + secundare) și determină aceste manifestări, indiferent de calea de intrare. Pot produce manifestări clinice diferite, condiționate de poarta de intrare:

Bacillus anthracis: pătruns pe cale cutanată determină cărbune cutanat;

„	„	digestivă	„	„	digestiv;
„	„	respiratorie	„	„	pulmonar.

În tabelul nr. 6 sunt prezentate principalele tipuri de infecții în funcție de poarta de intrare, mecanismele locale de apărare ale gazdei, ca și mecanismele de evitare a acestora de către agenții patogeni virulenți.

INFECȚIA – definiție

Prin *infecție* se înțelege totalitatea proceselor biologice care se desfășoară în organismul uman sau animal, ca urmare a pătrunderii și multiplicării agentului patogen. Acesta trebuie să pătrundă într-o doză suficientă, care să permită multiplicarea agentului infecțios și colonizarea consecutivă a gazdei. Relația agent patogen – gazdă este o relație ecologică, în care agentul patogen este forța motrice a procesului infecțios, iar reactivitatea organismului modulează evoluția acestui proces.

a) Clasificarea infecțiilor după specificitatea relației agent patogen – proces infecțios; în funcție de acest criteriu, există mai multe tipuri de infecții:

- 1) Infecții determinate de un anumit agent patogen; ex.: *Clostridium tetani* – tetanos; *Treponema pallidum* – sifilis ș.a..;
- 2) Infecții lipsite de specificitate: nefrite – produse de diferiți agenți patogeni, cum ar fi: *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*; meningite, peritonite determinate de diferiți agenți patogeni;
- 3) Infecții cu specificitate medie: de ex. *Mycobacterium tuberculosis* este agentul etiologic al tuberculozei pulmonare, dar și unor forme renale, osoase.

b) Clasificarea infecțiilor în funcție de perioada de viață în care se pot instala:

- 1) infecții germinale – celulele sexuale sunt invadate de agenți infecțioși, ajungând apoi în zigot; nu există astfel de cazuri la om și organismele superioare în general, ci doar la artropode;
- 2) infecții transplacentare – în cursul vieții intrauterine, în condițiile existenței unor infecții prealabile (cu *Treponema pallidum*, *Brucella sp.*, *Coxiella burnetii*) sau produse în această perioadă (cu virusurile rubeolic, rujeolic – care pot determina malformații congenitale);
- 3) infecții *intrapartum* – inițiate în timpul nașterii, cu bacterii patogene sau potențial

patogene din tractul genital feminin (ex.: oftalmia gonococică – *Neisseria gonorrhoeae*);

Tabel nr. 6. Principalele tipuri de infecții după localizare, care corespunde porții de intrare în organism a agentului patogen și mijloacele de apărare ale gazdei, cărora le corespund anumite mecanisme de evitare a acestor reacții de către agenții infecțioși (mecanisme de virulență).

Tipuri de infecții după localizare	Mijloace de apărare ale gazdei	Mecanisme de virulență ale agenților infecțioși, de evitare a reacțiilor de apărare ale gazdei	Exemple
Infecții ale tractului respirator	<i>Clearance</i> -ul mucociliar, Macrofage alveolare	Aderența la celulele epiteliale Interferența cu acțiunea cililor celulelor epiteliale Replicarea în macrofagele alveolare	Virusuri gripale și alte virusuri ale tr.respirator <i>Bordetella pertussis</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Infecții ale tractului intestinal	Mucus, peristaltism pH acid, bilă	Aderența la celulele epiteliale Rezistența la aciditate, bilă	Rotavirusuri <i>Salmonella sp.</i> Virusul poliomiелitic
Infecții ale ficatului	Celulele Kupffer și celulele endoteliale	Localizarea în capilarele sinusoide și în celulele Kupffer și endoteliale	Virusuri hepatitice
Infecții ale aparatului genital	Acțiunea de spălare a fluxului urinii și a secrețiilor sexuale, mecanisme de apărare ale mucoaselor	Aderența la celulele epiteliale uretrale și vaginale	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i>
Infecții ale tractului urinar	Acțiunea de spălare a fluxului urinii	Aderența la uretră/celulele epiteliale	<i>Escherichia coli</i> Virusul poliomiелitic
Infecții ale sistemului nervos central	Bariera hematoencefalică	Pătrunderea în sistemul nervos central pe calea nervilor sau a vaselor de sânge	Meningita bacteriană Encefalita virală
Infecții ale pielii și mucoaselor	Straturi de celule constant umede (mucoase) Straturi de celule keratinizate moarte (piele)	Invazia pielii și mucoaselor din interior Infecția stratului epidermic bazal Infecții prin leziuni mici Penetrarea pielii intacte	Virusul varicelei, vir. pojarului Virusuri <i>Papiloma</i> <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> <i>Bacillus anthracis</i> <i>Schistosoma sp.</i>
Infecții ale sistemului vascular	Integritatea tegumentului	Inocularea agentului patogen de către un vector Replicarea în celule ale sângelui sau în celulele endoteliale	<i>Plasmodium malariae</i> Virusul febrei galbene

- 4) infecții *postpartum*, care se produc după naștere, categorie în care intră majoritatea infecțiilor umane care se produc după vârsta de 5 – 6 luni, perioadă după care dispare protecția

exercitată de anticorpii materni transmiși transplacentar sau prin secreția lăctată, care conferă imunitate pasivă.

Starea caracteristică a organismului infectat, înainte de declanșarea simptomelor, este cea de *contaminare*. La poarta de intrare în organism agentul patogen trebuie să se multiplice, crescând șansa colonizării organismului odată cu realizarea condiției cantitative (doza infectantă) pentru apariția unui proces infecțios, deoarece la contaminare numărul de germeni este mic. Cu cât tulpina este mai virulentă, cu atât numărul de celule necesare declanșării procesului infecțios este mai mic. Consecința colonizării este apariția unui focar de inflamație (reacție de apărare locală însoțită de un aflux de fagocite și de apariția unei supurații).

Tipuri de infecții în funcție de gradul de extindere:

- 1) infecții localizate – reacțiile de apărare ale gazdei sunt încă eficiente;
- 2) infecții generalizate- reacțiile de apărare nu se pot opune agentului infecțios (care în mod normal ar putea fi localizat).

Infecția locală sau de focar este produsă de agenți patogeni care rămân la poarta de intrare în organism, difuzând pe cale sanguină sau nervoasă doar produșii toxici secretați de către aceștia. Infecția de focar este însoțită de o reacție inflamatorie locală minimă și de manifestări la distanță, determinate de produși toxici, enzimatici eliberați la nivelul focarului. Ex.: reumatism - streptococii rămân la poarta de intrare (amigdale), dar eliberează toxine și enzime difuzibile, antigenice, iar anticorpii antistreptococici reacționează încrucișat cu componente proprii gazdei.

În *infecțiile generalizate* sau invazive, după o perioadă de multiplicare la poarta de intrare, agenții patogeni diseminează în organism, prin:

- **contiguitate**: cei cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii, chlamidii) și care infectează celulele vecine;
- **continuitate**: infecții cavitare- infecții respiratorii, care avansează spre trasee înguste și determină bronșite, spre țesutul pulmonar- pneumonii, spre pleure- pleurite; infecții genitale;
- **cale limfatică**- agenții patogeni sunt preluați de la suprafața tegumentului și mucoaselor de către limfă și ajung în ganglionii limfatici, care nu pot reține toți agenții infecțioși dacă sunt numeroși, astfel că aceștia trec în sânge, determinând de ex. *bacteriemie* (bacteriile sunt totuși în număr mic), consecutivă infecțiilor ușoare, extracțiilor dentare, intervențiilor chirurgicale sau postprandial (la rumegătoare, mai puțin la om); în sânge bacteriile nu se multiplică (cu excepția *Yersinia sp.*, *B. anthracis*), dar pot provoca infecții regionale (+/- extinse) sau infecții generalizate. Dintr-o infecție regională, pe cale circulatorie, pot apărea localizări secundare unice sau multiple (miliare), evoluând spre o infecție generalizată sau

septicemie. Infecțiile septicemice se caracterizează printr-un număr mare de bacterii în sângele circulant, datorită descărcării masive dintr-o infecție regională sau focar și în aceste condiții poate avea loc și multiplicarea lor în sânge; uneori septicemia este însoțită de toxemie. Septicemia se datorează scăderii eficienței reacțiilor de apărare ale gazdei.

Alte manifestări clinice ale patologiei infecțioase

- 1) **Intoxicația** – botulism alimentar (incidență mică) – datorat consumului de alimente contaminate cu spori ai agentului patogen (*Clostridium botulinum*), incapabil să colonizeze gazda; în cursul germinării și multiplicării în alimente (în general conserve sterilizate incorect), bacteriile sintetizează toxina botulinică, care va pătrunde în organism odată cu alimentele contaminate;
- 2) **Toxiinfecția** – bacteriile se multiplică la poarta de intrare în organism și produc toxine care difuzează în organism; ex.: *Clostridium tetani* – toxina difuzează spre neuronii motori și determină leziuni caracteristice; *Corynebacterium diphtheriae* – se localizează în gât, toxina difuzând spre celulele musculare cardiace, celulele renale; -toxiinfecții alimentare (T.I.A.) – determinate de ingerarea alimentelor contaminate sau provenite de la animale bolnave; ex. de agenți ai T.I.A., ce sintetizează enterotoxine: *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*.

Evoluția procesului infecțios

Infecție inaparentă - procesul infecțios nu se exteriorizează prin simptome clinice de boală, dar se pozitivează reacțiile imunologice: Ex.: TBC inaparentă – reacție de hipersensibilitate întârziată cutanată - I.D.R. la tuberculină; reacția trebuie să fie slab pozitivă la toți indivizii vaccinați, dar intens pozitivă doar la cei bolnavi (reacția se exprimă în 48 ore, printr-o papulă roșie, indurată).

Infecție aparentă – se exteriorizează prin simptome clinice de boală, produse de agentul infecțios și metaboliții sai.

Etapile procesului infecțios

- 1) **Incubația** – perioada inițială, asimptomatică = intervalul de timp de la pătrunderea agentului patogen în organism și până la debutul bolii; durata este variabilă în funcție de doza infectantă, virulența tulpinii, reactivitatea organismului. Agenții infecțioși se multiplică și sintetizează substanțe toxice; uneori manifestă histotropism, multiplicându-se preferențial în anumite țesuturi și organe: ex. *Vibrio cholerae* - în epiteliul intestinal, *Brucella sp.* - în placenta bovinelor, *Rickettsia prowazeki* - în endoteliul capilarelor, *Bordetella pertussis* –

în mucoasa bronșică, *B. anthracis* – în tot organismul, fără tropism.

- 2) **Debutul bolii** – momentul în care apar primele simptome de boală care pot fi specifice sau nespecifice (febră, cefalee, frisoane, diaree); marchează începutul perioadei de invazie.
- 3) **Perioada de stare** - bolile infecțioase prezintă un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maximă în această etapă. Perioada este decisivă pentru procesul infecțios; la sfârșitul acesteia simptomele dispar brusc (*in crisis*) sau lent (*in lysis*) și organismul poate rămâne vindecat bacteriologic sau doar clinic.
- 4) **Perioada de convalescență** – începe odată cu dispariția simptomelor; titrul anticorpilor este maxim; acești efectori imunitari umorali specifici, alături de alți efectori specifici și nespecfici pot conduce la sterilizarea focarului de infecție sau pot conduce la starea de purtător. Ex. *Salmonella typhimurium* – bacteriile rămân cantonate în vezicula biliară, fiind eliminate prin materiile fecale; *Streptococcus pyogenes* (tulpini lizogene - agenți patogeni ai scarlatinei) – bacteriile sunt eliminate timp de câteva săptămâni după perioada de stare.
- 5) **Infecție cronică** - organismul rămâne infectat și elimină germeni mulți ani, aceștia fiind într-o stare de echilibru cu gazda. Germenii rămân cantonați în viscere parenchimatoase, sinusuri, glande încapsulate (prostata), în pereții arterelor mari, unde anticorpii nu au acces. Bolile cronice se pot reacutiza (recădere): tuberculoza, bruceleza, tifosul exantematic.
- 6) **Starea de purtător**. Un organism este purtător al unor bacterii patogene, această stare putând fi precedată sau nu de o boală. Dacă numărul infecțiilor simptomatice (manifeste) ar constitui vârful *iceberg* -ului, partea submersă, nevazută a acestuia ar fi reprezentată de infecțiile asimptomatice prezente la indivizi care sunt purtători de agenți patogeni, care îi infectează pe alții și realizează seroconversia acestora. În cazul multor agenți infecțioși agresivi, este importantă depistarea purtătorilor (de ex., a purtătorilor de streptococi β -hemolitici din serogrupul A) și sterilizarea lor din punct de vedere microbiologic, aceasta fiind una din măsurile de prevenire a transmiterii bolilor infecțioase.

Tipuri de evoluție epidemiologică a infecției

Epidemiologia este știința care studiază căile de eliminare, transmitere și pătrundere a agenților infecțioși în organismul gazdă. Din punct de vedere epidemiologic procesul infecțios are manifestări spațio-temporale:

- **evoluție sporadică** - se caracterizează printr-un număr limitat de cazuri de îmbolnăviri în unitatea de timp;
- **evoluție endemică** – se caracterizează printr-un număr de cazuri relativ mic, dar care este

constant într-o colectivitate și prezintă o regularitate în timp; variațiile sezoniere au un rol în apariția acestor infecții cu caracter endemic, dar majoritatea indivizilor sunt imunizați;

- **evoluție epidemică** – se caracterizează printr-un număr mare de cazuri de îmbolnăviri într-un interval scurt de timp; gradul de extindere poate fi diferit, la nivel de cămin, cazarmă, sat, oraș, țară; ex. scarlatina, gripa, rujeola;
- **evoluție pandemică** – se caracterizează printr-o extindere rapidă (favorizată de mijloacele de transport pentru călători și mărfuri) pe un areal larg, la nivel de țări, continente; ex.- gripa. Populația unei zone poate fi sensibilă la agentul patogen din alta zonă, acesta putând să determine o epidemie explozivă; după instalarea stării de imunitate în populație, incidența cazurilor scade. La apariția de noi variante genetice și antigenice, cu virulență mare, ale agentului infecțios respectiv, epidemia se poate repeta.

Apariția epidemiilor este influențată de standardul economic (de ex. în cazul tuberculozei) și social (de ex. în cazul bolilor cu transmitere sexuală) al populației.

În continuare, sunt clasificate și caracterizate grupele mari de bacterii și microfungi, semnificative pentru patologia umană, mai detaliat sau mai succint, după cum sunt mai frecvent (ex. enterobacterii, stafilococi, streptococi, bacterii anaerobe) sau mai puțin frecvent izolate în laboratorul clinic.

Criteriile de clasificare sunt cele clasice, utilizate în bacteriologie: prezența sau absența peretelui celular, rigiditatea sau flexibilitatea acestuia, structura peretelui celular care determină comportamentul bacteriilor față de colorația Gram și le diferențiază în Gram pozitive și Gram negative, morfologia bacteriilor (coci, bacili – filamentoși, nefilamentoși sau incurbați), criterii fiziologice, cum ar fi capacitatea de sporogeneză, tipul respirator (bacterii aerobe, anaerobe, aerobe facultativ anaerobe), tipul de parazitism (extracelular sau intracelular – facultativ sau obligat) (tabel nr. 7). Sunt semnalate și cazuri în care anumite specii au fost reîncadrate taxonomic, datorită unor argumente furnizate de rezultatele metodelor de biologie moleculară.

Prezentarea fiecărui grup de microorganisme patogene, a biologiei, a mecanismelor de patogenitate și virulență la nivel molecular, a structurii lor antigenice, este însoțită și de principiile pe care se bazează diagnosticul de laborator al infecțiilor determinate de acestea (prin metode clasice și moderne), detaliate în ultimul capitol, deoarece o preocupare importantă a microbiologilor este stabilirea unui diagnostic microbiologic rapid și corect (care permite instituirea unui tratament timpuriu și țintit, ca și prevenirea complicațiilor), monitorizarea incidenței bolilor infecțioase, ca și stabilirea unor strategii de prevenire a acestor boli, cu scopul de a reduce morbiditatea și mortalitatea prin boli infecțioase.

După prezentarea grupelor de bacterii semnificative pentru patologia umană, este inclus și un capitol referitor la substanțele antibiotice, la modul lor de acțiune pe care se bazează utilizarea acestor substanțe în terapia antiinfecțioasă, ca și la fenomenul de rezistență și multirezistență la antibiotice, apărut ca efect al impactului ecologic exercitat de presiunea selectivă a antibioticelor asupra populațiilor bacteriene, fenomen de o amploare fără precedent și cu o semnificație deosebită, în sensul necesității monitorizării fenomenului și aplicării unor măsuri destinate reducerii acestuia, pentru ca antibioticele să fie în continuare active.

Principalele grupe de microorganisme patogene

– caractere generale și diagnosticul de laborator al infecțiilor determinate

Tabel nr. 7. Clasificarea bacteriilor importante din punct de vedere medical.

Caracteristici	Genul	Boli reprezentative
I. Bacterii cu perete celular gros, rigid Bacterii parazite extracelular 1. Gram-pozitive a. Coci <i>Staphylococcus sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i> Abcese ale pielii sau altor organe Pneumonie, faringită, amigdalită b. Bacili sporogeni 1) Aerobi <i>Bacillus anthracis</i> 2) Anaerobi <i>Clostridium sp.</i> Antrax Tetanos, gangrena gazoasă, botulism c. Bacili nesporogeni 1) Nefilamentoși <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Listeria</i> 2) Filamentoși <i>Actinomyces sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> Difterie Meningită Actinomicoză Nocardioză 2. Gram-negative a. Coci <i>Neisseria sp.</i> Gonoree, meningită b. Bacili 1) Facultativ anaerobi i) Drepti - Respiratori <i>Haemophilus sp.</i> <i>Bordetella sp.</i> <i>Legionella sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter sp.</i> <i>Serratia sp.</i> <i>Klebsiella sp.</i> <i>Salmonella sp.</i> <i>Shigella sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Brucella sp.</i> <i>Campylobacter sp.</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Bacteroides sp.</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Rickettsia sp.</i> <i>Bartonella sp.</i> <i>Chlamydia sp.</i> - Enterici Pneumonie, infecții urinare, diaree Infecții urinare Pneumonie Pneumonie, infecții urinare Febra tifoidă, enterocolite Enterocolite Infecție urinară Ciumă Bruceloză Enterocolite Gastrite, ulcer peptic Holera Pneumonie, infecții urinare Pneumonie, septicemie, infecții urinare Peritonită Tuberculoză, lepră Tifos exantematic și pulmonar, febra butonoasă Fb.de tranșee, boala ghearelor de pisică - Zoonotici ii) Incurbați 2) Aerobi 3) Anaerobi 2) Aerobi 3) Anaerobi 3) Anaerobi 3. Acidoalcoolorezistente Bacterii parazite obligat intracelular		
II. Bacterii cu perete celular subțire, flexibil (spirochete)	<i>Treponema sp.</i> <i>Borrelia sp.</i> <i>Leptospira sp.</i>	Sifilis Boala Lyme Leptospiroză
III. Bacterii fără perete celular	<i>Mycoplasma sp.</i>	Pneumonie, infecții genitale

COCI GRAM POZITIVI

Staphylococcus sp.

In manualul Bergey , editia din 1986, stafilococii au urmatoarea incadrare taxonomica :

Fam. **MICROCOCCACEAE**

Micrococcus sp.

Planococcus sp.

Stomatococcus sp.

Staphylococcus sp

Studiile la nivel molecular, bazate pe experimente de hibridizare si stabilirea gradului de omologie a acizilor nucleici, la care s-a adaugat si analiza altor proprietati (compozitia chimica a peretelui celular, determinarea continutului in acizi grasi celulari) au demonstrat ca aceste genuri nu sunt foarte inrudite, asa cum se credea; astfel genul *Micrococcus* este mai inrudit cu actinomicetele, iar speciile apartinand genului *Staphylococcus* sunt genetic mai asemanatoare cu streptococii, enterococii, lactobacilii, ca si cu speciile genului *Bacillus*.

Aceste bacterii sunt larg raspandite in natura, fiind prezente in mediul acvatic, in sol si aer, dar si in calitate de comensali pe piele si mucoase, la om si animale.

Multe specii sunt patogene, fiind microorganisme cel mai frecvent izolate din probele biologice in laboratoarele de microbiologie medicala, dupa enterobacterii. Distributia ubicvitara a unor bacterii Gram pozitive in natura face dificila interpretarea rezultatelor analizelor, cu exceptia cazurilor in care boala infectioasa respectiva are manifestari clinice clasice. Desi bacteriile Gram pozitive pot cauza infectii prin multiplicare atat locala, cat si sistemica, majoritatea se multiplica local si exercita efecte patogene prin produse metabolice eliminate in mediu (exotoxine si exoenzime), care actioneaza la distanta. Toxinele stafilococice sunt responsabile pentru toxiinfectiile alimentare, sindromul de descuamare a pielii si pentru TSS (*toxic shock syndrome*).

Micrococcus sp. (9 specii): speciile incadrate in acest gen sunt prezente in mediul extern, dar sunt si componente posibile ale microbiotei de tranzitie (alohtone) a tegumentelor la om si alte mamifere. Anumite specii sunt cromopare, producând pigmenti carotenoizi care coloreaza coloniile in galben sau roz, ceea ce explica utilizarea ca lor microorganisme indicatoare, pentru detectarea agentilor antimicrobieni in hrana animalelor, cosmetice si in lichide biologice. Se pot manifesta ca oportunisti la gazde imunocompromise. Astfel, recent au fost raportate cazuri de infectii asociate cateterelor, peritonite, corelate cu procedura de dializa peritoneala.

Planococcus sp.: acest gen include specii prezente in apa, aer, sol, care nu sunt implicate in patologia umana. Sunt frecvente in mediul marin, comensale ale florei si faunei oceanice, ca si

in hrana de origine marina inghetata. Celulele sferice, flagelate, sunt grupate in gramezi sau in tetrade. Nu fermenteaza zaharurile, sunt halotolerante (1 - 15 %). Sintetizeaza un pigment galben-portocaliu pe geloza nutritiva (*P. citreus* si *P. kocuri*).

Stomatococcus mucilaginosus este o specie (numita anterior *Micrococcus mucilaginosus*) de coci capsulati care sunt membri ai microbiotei normale a tractului respirator la om. Bacteria este imobila, slab catalazo-pozitiva sau chiar negativa; nu creste pe geloza cu 5% NaCl, ceea ce permite diferentierea de *Micrococcus* si *Staphylococcus*. Culturile sunt mucilaginoase.

Prima infectie a fost raportata in 1978, la un pacient cu endocardita, postcateterizare cardiaca. Apoi, au fost semnalate si alte cazuri de endocardita la pacienti cu valve protetice. In general, infectiile au fost asociate cu traumatisme la cap si la gât, cu utilizarea de catetere centrale si periferice, cu procedura de cateterizare cardiaca postinfarct miocardic, cu dializa peritoneala continua in ambulator, cu chemoterapia anticanceroasa. Au fost raportate ca infectii secundare care insotesc diferite tipuri de cancer, la pacientii cu transplant de maduva. La acesti pacienti este prezenta bacteriemia tranzitorie sau persistenta, infectii asociate dispozitivelor protetice (pe care se pot dezvolta biofilme bacteriene) si meningite. Pacientii prezinta neutropenie consecutiva bolii primare, imunosupresiei sau chemoterapiei. Aceasta specie poate fi si agentul cauzal al endoftalmitei, consecutiva implantarii lentilelor de contact; a fost izolata si din bila, de la pacienti cu colangita.

Dintre bacteriile incadrate intre micrococacee, cele mai implicate in patologia umana sunt stafilococii, care determina un mare numar de boli: foliculite, furuncule, abcese, endocardite si infectii asociate dispozitivelor protetice confectionate din biopolimeri etc. Alte afectiuni sunt determinate de toxinele stafilococice, cum sunt: toxiinfectiile alimentare, sindromul de descumare a pielii, TSS (*toxic shock syndrome*).

Caractere: coci Gram pozitivi, grupati in gramezi neregulate (fig. 11), nesporogeni, aerobi, facultativ anaerobi (exista si coci Gram pozitivi strict anaerobi, membri ai microbiotei intestinale normale: *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*), catalazo-pozitivi, care fermenteaza glucoza si determina acidifierea mediului), fara producere de gaz.

Speciile de stafilococi cel mai frecvent izolate in clinica sunt: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophiticus*.

S. aureus subsp. *aureus* este specia patogena cea mai importanta pentru om dintre stafilococi, fiind prezenta in mediul extern, dar si in narile a 20 – 40 % dintre indivizi. Alte situsuri de colonizare: pliuri ale pielii, perineu, axile, vagin. Desi este un frecvent membru al microbiotei normale, poate determina infectii oportuniste. Factorii predispozanti sunt:

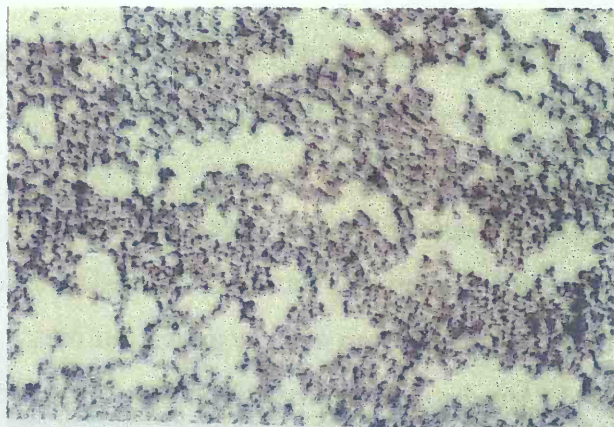


Fig. 11. Imagine la microscopul optic a unui preparat colorat Gram efectuat dintr-o cultura de *Staphylococcus aureus* in care se observa coci dispusi in gramezi neregulate (marire : x 2500).

deficiente de opsonizare (hipogamaglobulinemie), deficiente ale activitatii microbicide consecutive fagocitarii germenilor (granulomatoza cronica), leziuni ale pielii (arsuri, incizii chirurgicale, eczeme), prezenta de corpi straini : suturi, catetere intravenoase, dispozitive protetice, infectii virale (gripa), boli cronice (boli maligne, alcoolism, boli cardiace).

S. aureus este o specie coagulazo - pozitiva, cu proprietati hemolitice, patogena la om si animale. Denumirea speciei se datoreaza producerii unui pigment auriu in conditii favorabile de crestere. In conditii de mediu nefavorabil se pierde capacitatea de pigmentogeneza, ca si cea a producerii de coagulaza. Bacteriile au forma sferica, cu un diametru ce variaza intre 0,8 – 1 μm ; cocii sunt izolati in mediu lichid si grupati in gramezi când provin de pe medii solide. Celulele prezinta fimbrii si o microcapsula, ce poate fi evidentiata la celule din culturi de patru ore in bulion nutritiv, prin tehnica coloratiei negative cu tus de China. Aceste structuri extraparietale mediaza aderenta la substraturi sensibile si au rol antifagocitar direct si indirect, având efect chimiotactic negativ. Stafilococii, bacterii Gram pozitive, prezinta un perete celular tipic structurat acestui grup, componentele majore fiind mureina, acizii teichoici si stratul proteic paracristalin, proteina A fiind predominanta si specifica speciei *S. aureus* (cu exceptia speciei *S. epidermidis hyicus*).

Particularitati fiziologice. Dezvoltarea culturilor are loc in aerobioza, stafilococii fiind facultativ anaerobi. Sinteza toxinelor este favorizata de cresterea in atmosfera de CO_2 5-10%. Temperatura optima de dezvoltare variaza intre 30 – 37°C, pH-ul optim variaza intre 7 – 7,5.

Exigentele nutritive sunt minime, totusi speciile patogene necesita prezenta in mediu a aminoacizilor si a factorilor de crestere (tiamina, acid nicotinic). Dupa 16 – 18 ore de incubare, culturile in mediu lichid sunt tulburi uniforme, iar culturile pe mediu solid permit observarea

coloniilor circulare ($\Phi = 1\text{mm}$), bombate, opace, cu o consistență cremoasă, cu margini regulate, suprafața netedă, lucioasă, pigmentată în galben citrin. Cercetarea pigmentogenezei se face prin cultivare în prezența serului bovin coagulat, cu incubare timp de 27h la 37°C și apoi 24h la 25°C , la lumina zilei. Există și tulpini de *S. aureus* care nu produc pigment. Importanța pentru identificare este producerea de *coagulază*. Producerea de catalază permite diferențierea de *Streptococcus sp.* Fermentează manitolul și crește în prezența unei concentrații mari de NaCl – 7,5 - 10%. Halotolerantă și fermentarea manitolului permit diferențierea speciei *S. aureus* de *S. epidermidis*, pe mediul Chapman (mediu hipersalin și cu adăugare de manitol).

Rezistența la factori fizico-chimici. Stafilococii au o rezistență mare la uscăciune, rezistând timp de săptămâni și luni în produse biologice uscate (puroi, sputa), dar și în praful de camera și chiar în nisipul plajelor. Sunt distrusi prin expunere la 60°C , timp de 30 min., în prezența fenolului 5%, timp de 10 min și a alcoolului etilic de 70° , timp de o ora. Fenomenul de rezistență la antibiotice rezistente la penicilinază (ex. meticilina) este foarte frecvent printre tulpinile de *S. aureus*, care pot fi cauza unor infecții nosocomiale dificil de tratat, tratamentul de elecție al acestora făcându-se cu vancomicină.

Structura antigenică.

- 1) Ag polizaharidice – A – componentul major, derivat al acidului teichoic (acid ribitolteichoic) care conferă specificitate de specie pentru *S. aureus*.
 - B – acid glicerolteichoic, caracteristic speciei *S. epidermidis*.
- 2) Ag proteice- **proteina A** – bazică, situată superficial; este caracteristică speciei *S. aureus*, fiind un factor de agresivitate, prin efectul antifagocitar. Este imunogenă, Ac anti proteina A fiind prezenți la indivizii cu infecții grave ;
 - este precipitată și de serurile neimune, deoarece se leagă de regiunea Fc a imunoglobulinelor din complexe imune sau cele cu funcție de receptori celulari (nespecific; proteina A izolată de la tulpina Cowan este utilizată pentru separarea complexelor imune și a celulelor cu receptori Ig).

Diferențierea serologică a stafilococilor nu este necesară, identificarea tulpinilor de *S. aureus* făcându-se prin **tipizare fagică**.

Factori de virulență.

- microcapsula – factor de agresivitate care mediază aderența la țesutul sensibil;
- exoenzime – *coagulaze*: 1) *libera* (determină coagularea plasmei, localizarea infecției și blocarea accesului factorilor bactericizi) și *legată* (*clumping factor*);
- hialuronidază – factor de invazie care acționează la începutul infecției, pentru ca procesul inflamator să inhibe acțiunea acestei enzime;
- stafilokinază = fibrinolizina (factor de difuzie);

- fosfataza acida (determina scaderea pH-ului mediului in focarul de infectie);
- lipazele (actioneaza asupra lipidelor plasmaticice si tegumentare, ceea ce explica tropismul si colonizarea tegumentelor cu glande sebacee active);
- nucleazele = fosfodiesteraze, care desfac moleculele de ADN si ARN in nucleotide;
- toxine – hemolizine – actiune hemolitica si dermonecrotica;
 - α - toxina stafilococica $\Rightarrow$ hemoliza de tip β ; actiune citotoxica selectiva asupra celulelor musculare netede din peretii vaselor sanguine $\Rightarrow$ vasoconstrictie $\Rightarrow$ ischemie si necroza tisulara;
 - β - toxina $\Rightarrow$ hemoliza cald-rece (zona de liza este neclara dupa incubare la 37°C, dar se clarifica la periferie, dupa mentinere 24 de ore la frigider);
- enterotoxine – difuzibile, manifesta tropism pentru mucoasa intestinala; 6 tipuri antigenice (A - F), codificate de determinanti genetici cromozomali sau plasmidiali; termorezistente (rezista 30 min la fierbere); pot fi evidentiata prin difuzie in gel; prezente la tulpinile producatoare de termonucleaze;
- leucocidina – fagocitele sunt lizate; acumularea resturilor celulare + bacterii $\Rightarrow$ puroi;
- toxina epidermolitica si exfolianta – codificata de plasmide, diferite de cele care determina rezistenta la peniciline.

Tulpinile izolate de la om apartin la 6 biotipuri, diferite dupa caracterele de cultura, biochimice, specificitatea de gazda, sensibilitatea la bacteriofagi (tulpinile din grupul fagic 2 au tropism pentru tesutul cutanat si determina infectii tegumentare).

S. epidermidis este o specie coagulazo-negativa, sensibila la novobiocina, comensal al tegumentelor, care determina frecvent infectii asociate cateterelor, la indivizii imunocompromisi.

***S. aureus* – localizare si patogenie**

Bacteriile sunt prezente in vestibulul nazal, de unde colonizeaza tegumentele, intestinul subtire, colonul si alimentele. Sunt conditionat patogene, determinând infectii minore sau grave:

1. Foliculite superficiale, impetigo (infectie frecventa la copii) ;
2. Septicemii ;
3. Meningite ;
4. Endocardite.

Dupa localizare infectiile stafilococice pot fi:

- la poarta de intrare – la nivelul pielii si mucoaselor; grupul fagic 2 cuprinde stafilococi cu tropism pentru tesutul cutanat; elimina toxine codificate de plasmide care produc «sindromul pielii oparite » la copii, ca si leziuni la distanta, caracterizate prin distrugerea substantei-ciment si exfolierea epidermei ;

ex.: foliculite ale genelor (*orgelet* = urcior), foliculite profunde (furuncul), in care infectia este prezenta la nivelul foliculului, dar si al glandei perifoliculare, acnee pustuloasa, hidrosadenita (infectii ale glandelor sudoripare), plagi sau arsuri contaminate, infectii ale tractului respirator superior sau inferior (pneumonii, care sunt frecvente la persoane in vârstă, după viroze, dar si ca infectii cu transmitere nosocomială), otite, conjunctivite. Stafilococii pot fi prezenti in numar mare si postantibiotapie cu antibiotice de spectru larg, determinând enterocolita spitalizatorilor (ulceratii si necroza);

- la nivelul aparatului urinar – staza urinara favorizeaza multiplicarea stafilococilor in vezica urinara si apoi infectiile pe cale ascendenta, ale ureterelor si rinichilor;
- la nivelul tractului genital feminin pot determina infectii ale trompelor uterine (salpingite), ovarite si pelviperitonite;
- la nivelul sistemului osos pot produce osteomielite;

Deși bacteriile Gram pozitive pot cauza infectii prin multiplicare atât locală, cât si sistemică, majoritatea se multiplica local si exercita efecte patogene prin producerea de exotoxine si/sau exoenzime care actioneaza la distanta. Toxinele stafilococice sunt responsabile pentru toxiinfectiile alimentare (ocupând locul secund, după cele determinate de speciile enterotoxigene de *Salmonella*), sindromul de descuamare a pielii, TSS (*toxic shock syndrome*):

- prima semnalare a acestei boli sistemice – 1978 — sindrom clinic: febra, hipotensiune, vertij de ortostatism, erythroderma, vomismente, diaree;
- mai frecvent la femei si in special in perioada menstruatiei; astfel se explica asocierea care s-a facut cu utilizarea tampoanelor hiperabsorbante (prin scaderea locală a ionilor de Mg); ulterior s-au semnalat cazuri de TSS atât la femei, cât si la barbati, acest sindrom fiind considerat o complicatie a abceselor stafilococice, osteomielitei, ale infectiilor de plaga postchirurgicală si ale pneumoniilor postgripale;
- in 1981 s-a postulat ca TSS este determinat de toxine; au fost descrise 2 toxine:
 - exotoxina pirogenica tip C;
 - enterotoxina stafilococica F = toxina -1 TSS;
- ulterior s-a demonstrat ca TSS este determinat de urmasorii produși metabolici:
 - TSST-1 (s-a dovedit ca cele 2 toxine mentionate anterior sunt identice si sunt denumite acum astfel);
 - enterotoxina stafilococica;
 - exfoliatine;
- acesti produși sunt considerati a avea o activitate de **superantigene**, care determina eliberarea de citokine (monokine, limfokine) si explica evolutia sistemică a sindromului socului toxic.

TSST (*Toxic Shock Syndrome Toxin*) = Toxina care determina sindromul de soc toxic, este considerata un **superantigen** produs in primul rând de anumite tulpini de *Staphylococcus*

aureus, ca si de anumite tulpini de *Streptococcus pyogenes*. Spre deosebire de antigenele obisnuite care activeaza una – câteva clone de limfocite Th, TSST activeaza un mare numar de limfocite Th. Aceasta toxina se leaga direct de moleculele CMH clasa II, fara a mai fi internalizata si prelucrata. Acest complex interactioneaza cu lantul β al receptorului T celular ($V\beta$ al TCR) al multor celule Th, determinând activarea lor si eliberarea consecutiva unor mari cantitati de IL-2, ca si a IL-1 din macrofage. Aceste interleukine sunt responsabile de multe dintre simptomele socului toxic. TSST este de asemenea un mitogen al limfocitelor T, ceea ce determina o supraproductie de citokine. Enterotoxina stafilococica, care determina toxiinfecție alimentara, are un mod similar de actiune, dar actioneaza local la nivelul tractului intestinal si cauzeaza voma si diaree.

Diagnosticul de laborator al infectiilor stafilococice se face in urmatoarele etape (Anexe I-IV):

- recoltarea produselor patologice (de ex. exudat nazo-faringian) si izolarea in cultura pura a tulpinii stafilococice (fig. 55);
- examinarea caracterelor de cultura pe mediu lichid si solid;
- evidentierea pigmentogenezei;
- examenul microscopic al frotiurilor colorate prin metoda Gram (coci Gram pozitivi);
- testul hemolizei (culturi dezvoltate pe geloza-sânge);
- testul catalazei (prin aplicarea a 1 – 2 picaturi de H_2O_2 3%, pe cultura dezvoltata pe geloza simpla; interzis a se efectua testul pe geloza-sânge, testul putând fi fals pozitiv);
- testul coagulazei pe lama (se executa punând in contact o picatura de plasma si cultura stafilococica de testat, dezvoltata pe mediu solid - evidentiaza coagulaza legata = *clumping factor*) si in tub (se face un amestec de plasma si cultura dezvoltata in mediu lichid; se fac observatii la 30 min, 1, 2, 3 si 4 ore – testul evidentiaza coagulaza libera);
- testul termonucleazei (pe mediu cu ADN si albastru de toluidina – vezi Anexa IX), pentru evidentierea tulpinilor producatoare de enterotoxina (prin metoda difuziei in gel); enterotoxina stafilococica se numara printre cele mai termorezistente; perioada de incubare, de la ingerarea alimentelor contaminate cu stafilococi producatori de enterotoxina si eliminata in alimente in perioada de crestere bacteriana, pâna la manifestarile toxiinfecției (diaree), este de 6 ore; alimente si factori de risc: produse de carne, peste, lactate, creme, maioneze, diferite amestecuri (inclusiv salate), aciditatea gastrica scazuta, insuficienta tratare termica. Pragul de detectie al enterotoxinei si al DN-azei termostabile este de $10^5 - 10^6$ bacterii/ g aliment; aceste caractere, producerea de enterotoxina si DN-aza, sunt frecvent asociate;
- teste biochimice (vezi anexa IV): testul de fermentare a manitolului; in jurul coloniilor de *S.aureus* care fermenteaza manitolul cu producere de acizi, mediul vireaza din rosu in galben;
- sisteme biochimice microtest de identificare: *API Staph* (BioMérieux); *Vitek GPI Card* (BioMérieux); *MicroScan Pos Id Panel* (Ca);

- Testarea sensibilitatii la antibiotice prin tehnica antibiogramei (vezi Cap. Diagnosticul microbiologic, fig. 59); sensibilitatea la novobiocina (caracter stabil, util identificarii) diferentiaza specia *S. epidermidis* de alte specii coagulazo-negative (*S. saprophyticus*, agent cauzal al infectiilor urinare, este rezistent la novobiocina);
- Tipizare fagica la nivelul Centrului de Referinta pentru Stafilococi (fig. 61).

Familia Streptococcaceae – *Streptococcus* sp.

Pe baza caracterelor fiziologice aceasta familie se diferentiaza in urmatoarele genuri:

- 1) *Aerococcus* sp. – cuprinde specii saprotrofe, prezente in aer, pe vegetale proaspete si conservate, in carne conservata; in general nepatogene pentru om, totusi sunt rar izolate din infectii urinare si endocardite. Ex. *A. viridans*.
- 2) *Gemella* sp. – cuprinde specii care se numara printre membrii microbiotei normale a tractului respirator superior (initial erau incluse intre neisserii, dar s-a observat ca au un perete celular foarte asemanator cu streptococaceele); bacterii conditionat- patogene, izolate din secretia bronsica si exudate faringiene, dar si din abcese, plagi, endocardite. Ex.: *G. haemolisans*.
- celulele acestor genuri sunt grupate in tetrade si pachete (si nu in lanturi);
- 3) *Leuconostoc* sp. – include specii care au fost considerate mult timp ca nepatogene pentru om, fiind izolate din fructe, vegetale si produse lactate; recent au fost izolate din meningite si septicemii. Ex. *Leuconostoc mezenteroides*.
- 4) *Pediococcus* sp. – include specii prezente in materia vegetala aflata in descompunere fermentativa; participa la fermentarea berii - ex. *Pediococcus cerevisiae*.
- 5) *Lactococcus garviae*; ca si *Pediococcus* sp., poate determina septicemii;
- 6) *Streptococcus* sp. – gen care grupeaza multe specii saprotrofe, patogene si conditionat-patogene, la om si animale.

Caractere generale ale streptococilor

Morfologie: coci Gram pozitivi, sferici, ovoizi, grupati in lanturi de lungime variabila; pe medii de cultura corespunzatoare lungimea lanturilor este mare, astfel ca la microscop, apar ca o retea (gr. *streptos* = impletit)

Caractere metabolice: aerobi facultativ anaerobi si strict anaerobi (*Peptostreptococcus*); fermenteaza glucoza cu producere numai de acid lactic (homofermentativi), catalazo-negativi si oxidazo-negativi; prin aceste caractere se diferentiaza de stafilococi, care sunt catalazo-pozitivi si oxidazo-negativi si de neisserii, coci Gram negativi, catalazo-pozitivi si oxidazo-pozitivi.

Clasificarea streptococilor se face in functie de mai multe criterii, astfel :

I) Dupa tipul de hemoliza:

- streptococii β -hemolitici – cuprind majoritatea speciilor patogene pentru om si animale; produc hemoliza clara in jurul coloniilor, datorita hemolizinei numita *streptolizina S (SLS)*; acest tip de hemoliza este caracteristic streptococilor din grupele serologice A, B, C, G;
- streptococii α - hemolitici – produc o hemoliza cu nuanza verzuie in jurul coloniilor, dar dupa 24 ore se observa un inel de β -hemoliza; hemoliza α = tip *viridans* este caracteristica speciilor *S. viridans*, *Enterococcus faecalis* (= *S. faecalis*), *S. pneumoniae* ;
- streptococi care produc hemoliza α' - incompleta, cu aspect voalat, pe zonele de hemoliza aparând hematii nelizate; acest tip de hemoliza este caracteristic unor streptococi din grupele serologice B si D ;
- streptococii γ - nehemolitici, apartin grupului serologic D (fig. 12).

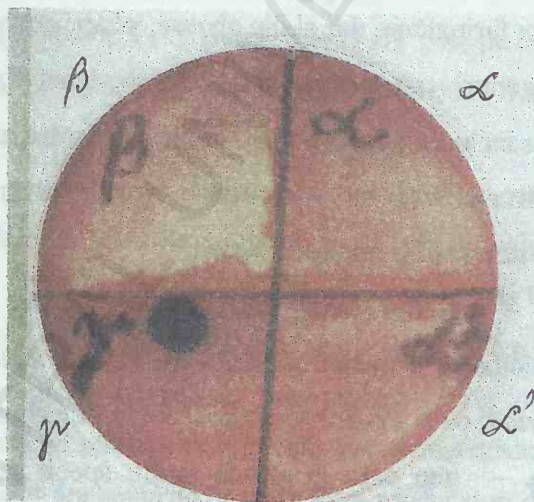


Fig. 12. Tipurile de hemoliza caracteristice streptococilor.

II) Dupa structura antigenica :

- clasificare inceputa din 1928 (Rebecca Lancefield), bazata pe specificitatea antigenica a unui antigen polizaharidic din peretele celular, denumit substanta C (carbohidrat streptococic) – grupele A, B, C, G, F, ca si pe baza acizilor teichoici (grupul D). In functie de aceste antigene, streptococii sunt impartiti in 18 grupe serologice, notate A – H si K – T. Streptococii tip *viridans* nu sunt inclusi in aceasta clasificare.

III) Dupa habitat si patogenie :

- streptococi lactici - proveniti din vegetale, trec in lapte (grup serologic N); sunt folositi in industria fermentativa a laptelui;
- streptococi fecali - membri ai microbiotei intestinale normale la homeoterme, sunt conditionat patogeni ; de ex. *Enterococcus faecalis* ;
- streptococi orali – prezenti in microbiota mucoasei bucale (*S. viridans*) si la nivelul placii dentare (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. sobrinus*); sunt conditionat patogeni, astfel ca patrunti in circulatie pot determina endocardita ;
- **streptococi piogeni** - prezenti in tractul respirator superior la om si animale; sunt patogeni, determinând imbolnaviri variate, acute si cronice si complicatii ale acestora ;
- streptococi β - hemolitici – ex. *S. pyogenes* din grupul serologic A; specie sensibila la bacitracina, caracter util identificarii; coci grupati in lanturi (fig. 13) ;
- Streptococi α - hemolitici ; sunt conditionat patogeni – ex. *S. pneumoniae* (pneumococul – grupare caracteristica - diplococi capsulati – fig. 14) este o specie sensibila la optochin, caracter util identificarii; poate determina pneumonii, bronhopneumonii, meningite cu caracter recidivant; substanta C reactioneaza cu proteina C-reactiva (CRP) si activeaza raspunsul imun nespecific;
- streptococi din grupul serologic C :
 - *S. equisimilis* (specie izolata de la om)- β - hemolitic
 - *S. zooepidermicus* (specie izolata de la animale) - se transmite la om prin lapte nepasteurizat; ajuns in tractul respirator superior determina infectii la acest nivel, ca si glomerulonefrite acute post streptococice;
- streptococi din grupul serologic B – *S. agalactiae* - specie prezenta la bovine, dar si in tractul genital feminin, de unde poate trece la nou-nascut la care poate determina imbolnaviri grave, cu mortalitate mare (50%).
- streptococi din grupul serologic G - β -hemolitici; frecvent implicati in patogenia glomerulonefritei.

Streptococcus pyogenes - Caractere de cultura si metabolice

- coci grupati in lanturi (fig. 13), care in produse patologice au capsula constituita din acid hialuronic, cu rol in virulenta acestei specii;
- pe geloza- sânge formeaza colonii cu caractere diferite:

- *mucoïd - filante*; caracterul mucoïd se datorează faptului că germenii sunt capsulați chiar și în culturi tinere, când sunt izolați de la pacienți cu boli grave;
- *matt* - colonii turtite, margini regulate, cu tendința de a conflua (~hărți geografice); rezulta prin deshidratarea coloniilor mucoide, datorită hidrolizei acidului hialuronic de către hialuronidază streptococică;
- *glossy* - colonii rotunde, cu margini regulate, cu suprafața convexă, în centru formând un con lucios, vizibil la lupă;
- *rough* - colonii uscate, cu suprafața rugoasă (colonii R), cu margini crenelate, care se desprind ușor de pe mediu.

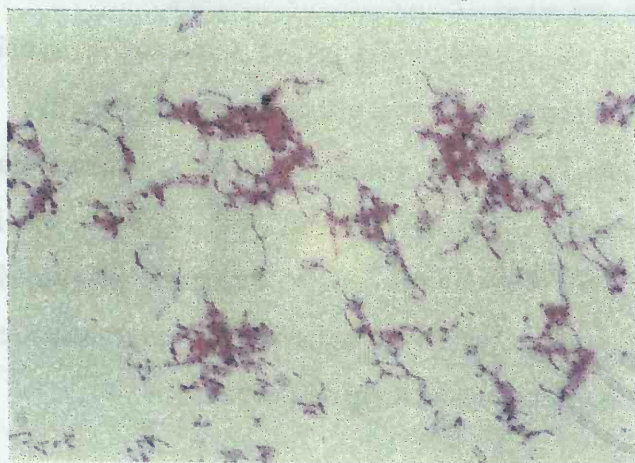


Fig. 13. Imagine la microscopul optic a unui preparat colorat Gram, efectuat dintr-o cultură de *Streptococcus pyogenes* în care se observă coci dispusi în lanțuri (mărire : x 1500).

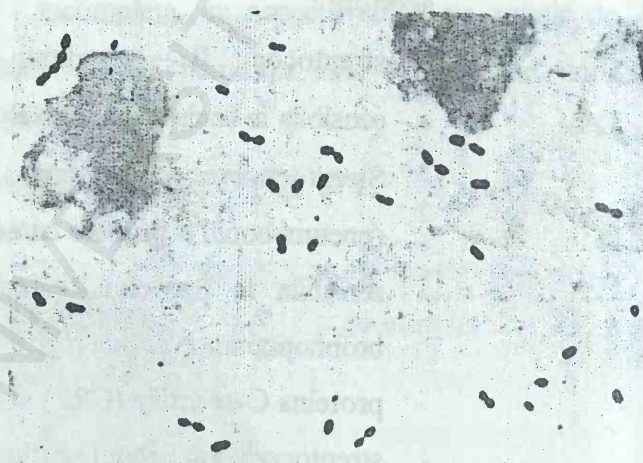


Fig. 14. Imagine la microscopul optic a unui preparat colorat Gram, în care se observă diplococi de *Streptococcus pneumoniae*, capsulați (halou clar în jurul celulelor) (mărire: x1500).

Această specie necesită pentru creștere și multiplicare un mediu de cultură care conține factori nutritivi cum ar fi: aminoacizi, vitamine hidrosolubile și glucoză; se adaugă sânge, ser de cal și lichid de ascită. Temperatura optimă de creștere este de 37°C, pH-ul optim = 7,4 - 7,6. Pe medii de cultură lichide aspectul culturii variază în funcție de virulența tulpinii cultivate: cultura cu aspect opac, cu depozit - tulpina virulentă; cultura cu aspect clar, cu depozit grunjos - tulpina nevirulentă.

Medii de cultură - lichide: bulion glucozat, bulion-ser, bulion-sânge, bulion-ascită;

- solide : geloza-sânge, geloza-ser.

Rezistența la agenți fizici și chimici - mor repede în mediul extern, sub acțiunea UV sau în condiții de uscăciune; mor prin expunere la 60°C timp de 1h; rezistă 3 - 4 luni la 4°C; sunt

distrusi de fenol 2 – 5 %, sublimat, apa oxigenata, iod, penicilina (antibiotic de electie in tratamentul infectiilor determinate de aceasta specie).

I. Structuri de suprafata implicate in virulenta si antigenitate

- 1) Capsula – constituita din acid hialuronic ; reprezinta un factor de virulenta prin actiunea de mediere a aderentei streptococilor la substratul celular sensibil si prin efectul antifagocitar; este distrusa de hialuronidaza produsa de celula streptococica (in perioada târzie a fazei logaritmice de crestere) - poate fi evidentiata numai in produse patologice sau in culturi tinere de maximum 18 h.
- 2) Peretele celular – este compus din 3 straturi : un strat proteic extern, un strat polizaharidic mediu si un strat peptidoglicanic intern. La exteriorul peretelui celular sunt prezenti determinanti antigenici, cu rol in aderenta si antifagocitar: acizii teichoici si lipoteichoici.
- 3) Fimbrile – strabat capsula, au rol in virulenta prin actiunea de mediere a aderentei streptococilor la substratul celular sensibil si prin efectul antifagocitar.

Stratul parietal proteic

Proteina M. Determina specificitatea de tip; astfel, streptococii serogrupului A se impart in peste 80 tipuri serologice; anticorpii anti - M sunt specifici de tip si au rol protector (imunitate specifica de tip, nu incrucisata); au fost identificate 80 tipuri de Ac anti-M.

MAP (M- associated protein). Legata de proteina M se afla o fractie proteica MAP nespecifica de tip, greu de disociat de M, care determina reactii de hipersensibilitate si reactiile imunologice incrucisate, cu diferite tesuturi din organismul uman (fibra musculara cardiaca, membrana glomerulara, tesutul conjunctiv), conducând la complicatii ale infectiilor streptococice (cardita reumatismala, glomerulonefrita poststreptococica, reumatism articular acut). Proteina MAP este antigenica, dozarea Ac-lor indusi de aceasta proteina fiind utila in diagnosticul complicatiilor poststreptococice. Titrul acestor Ac creste in cursul infectiilor repetate si se mentine crescut chiar ani, ceea ce permite diagnosticul retrospectiv.

Proteina P nu are rol in virulenta; este antigenica si permite serotiparea streptococilor de grup A in serotipuri (T) in studii de epidemiologie.

SOF (factorul de serumopacitate) = o lipoproteinaza care opacifiaza mediul care contine ser de cal; este antigenica.

Stratul polizaharidic. In structura acestuia exista carbohidratul specific = substanta C = ACHO, care determina **specificitatea de grup**; este antigenica. Ac anti- ACHO apar tardiv intr-o infectie streptococica, titrul lor creste in infectii repetate si in complicatii poststreptococice (de ex. : in

cardita reumatismala se remarca un titru mare de Ac timp indelungat, deoarece exista o relatie de asemanare structurala intre polizaharidul C si glicoproteinele din valvula cardiaca).

II. Componente extracelulare eliberate de streptococi, cu rol in virulenta si antigenitate

1. **Enzime- hemolizine = streptolizine :** a) **SLO** – streptolizina O oxigen labila, activa in prezenta unui agent reductor; are efect citolitic, demonstrat experimental prin injectare i.v. la animale, la care are efect letal ; la om produce leziuni tisulare. Este puternic antigenica, inducând sinteza de Ac anti – SLO (ASLO); complexele Ag-Ac ASLO pot precipita in tesuturi, determinând fenomenul Arthus (reactie de hipersensibilitate) sau se depun in rinichi si membranele sinoviale, determinând leziuni prin activarea sistemului complement. Dozarea Ac ASLO este utila diagnosticului si aprecierii eficientei tratamentului ; b) **SLS** – streptolizina S oxigen stabila, determina fenomenul de hemoliza *in vitro*, in jurul coloniilor de streptococi.

Hialuronidaza- prezenta in culturi mai vechi de 4 ore; determina hidroliza acidului hialuronic capsular, dar si din tesutul conjunctiv al organismului infectat, fiind deci un factor de virulenta (agresina) care permeabilizeaza barierele epiteliale mucoase sau tisulare, favorizând astfel diseminarea streptococilor in organism; este antigenica.

Streptokinaza = fibrinolizina – hidrolizeaza fibrinogenul, inhibând formarea barierelor de fibrina, cu care organismul incearca sa limiteze infectia (factor de invazie); este antigenica.

Streptodornaza (dezoxiribonucleaza) – are un efect direct, de depolimerizare a moleculelor de ADN rezultate din degradarea leucocitelor si indirect, determinând consistenta vâscoasa a produselor patologice recoltate in cursul infectiilor supurative; este antigenica, iar rezultatele titrării anticorpilor anti – DN-aza se coroboreaza cu celelalte rezultate.

Proteinaza, impreuna cu mecanismele complexe de patogenitate bazate pe reactii imunologice incrucisate si fenomene de autoagresiune (datorate antigenelor heterofile prezente la specia *Streptococcus pyogenes* si la specia umana), contribuie la instalarea complicatiilor poststreptococice nesupurative.

2. **Toxine** – toxina eritrogena (scarlatinoasa = toxina Dick); este produsa si eliberata de streptococii grupului serologic A si implicata in eruptia cutanata caracteristica tabloului clinic al scarlatinei ; este produsa si de streptococi apartinând serogrupelor C si G. Sinteza acestei toxine este codificata de fagi temperati si deci realizata de tulpini lizogene de streptococi. Este de natura proteica si se disting 3 tipuri (A - mai frecvent, B si C); toate tipurile sunt antigenice, iar Ac

neutralizanti anti-toxina eritrogena confera imunitate organismului pentru toata viata. Toxina eritrogena produsa de *Streptococcus pyogenes*, are un mecanism de actiune similar cu cel al TSST, actionând ca un *superantigen*. Tulpinile bacteriene nelizogene nu pot determina scarlatina, dar pot fi agent cauzal al faringitelor si amigdalitelor.

Patogenia streptococilor. Varietatea mare a factorilor de virulenta determina si spectrul larg de imbolnaviri, care difera dupa poarta de intrare in organism a agentilor patogeni:

- cai respiratorii – infectii acute eruptive – scarlatina
 - infectii neeruptive – angina streptococica- eritematoasa sau pultacee;
- cale cutanata - infectii cutanate – impetigo (adesea ca infectie mixta strepto-stafilococica) = bube dulci (o forma de piodermita la copii);
 - intertrigo (pustule intre degete); erizipel; infectii de plaga;
- cale genitala - infectii la nivelul aparatului genital feminin - endometrite;

In cazul netratarii acestor infectii, pot evolua catre:

- complicatii supurative: otite, sinuzite, mastoidite, adenite, pneumonii, bronhopneumonii, flegmoane, flebite, celulite, meningite, septicemii, sindrom asemanator socului toxic (*Toxic Shock like – Syndrome = TS like-S*);
- complicatii tardive nesupurative: reumatism articular acut, glomerulonefrita post streptococica; eritem nodos, coree – la 14 – 20 de zile dupa o infectie netratata.

Imunitatea in infectiile streptococice:

1. Raspunsul imun mediat umoral – efectorii acestui tip de raspuns sunt anticorpii sintetizati de organismul infectat, fata de: a) componente endocelulare si b) extracelulare ale streptococilor, ca si fata de c) componente proprii organismului infectat (autoanticorpi).

- a) - anticorpi anti-M, anti-MAP (apar tardiv in cursul infectiei), anti- ACHO ;
- b) - anticorpi anti-SLO (ASLO), bine studiati, care apar repede dupa infectie (spre deosebire de anti-M si anti-MAP), inregistreaza un titru maxim la 2 saptamani dupa infectie, cu o zona de platou pâna la 6 saptamani si un titru bazal dupa 2 luni) ;
 - rezultatele titrarii ASLO se coroboreaza cu datele clinice si cu rezultatele dozarii altor anticorpi (de ex. cu anticorpii anti-MAP) ;
 - un titru ASLO fals (+) se poate datora unor infectii asociate: TBC, hepatita, nefroze – cazuri in care sunt prezente in ser si β - globuline, care neutralizeaza nespecific SLO, astfel ca se impune tratarea serului cu solutie de rivanol 0,4 %, pentru indepartarea inhibitorilor nespecifici) ;
 - o reactie fals (-) la testul ASLO este posibila atunci când serul de cercetat este infectat

cu *Bacillus subtilis* sau *Pseudomonas sp.*, bacterii strict aerobe care in timpul cresterii produc metaboliti cu efect de inactivare (nespecifica) a SLO ;

- **anticorpi anti-DN-aza**, prezinta titruri mari in infectii cutanate si in glomerulonefrita poststreptococica;
- **anticorpi anti- eritrotoxina** – se evidentiaza printr-o reactie (I.D.R.) *in vivo* - se injecteaza 0,1 ml de toxina pe fata anterioara a antebratului ; daca exista Ac anti-toxina Dick, acestia vor neutraliza toxina si nu apare roseata (reactie pozitiva); in cazul unei reactii negative pentru prezenta anticorpilor apare o papula rosie, dura, la locul injectarii; interpretare: ϕ papulei $> 10\text{mm} \Rightarrow$ scarlatina
- c) **autoanticorpi** – evidentierea lor este importanta in aprecierea evolutiei complicatiilor poststreptococice.

Raspunsul imun celular este evaluat prin teste *in vitro* si *in vivo* :

- teste *in vitro* :
 - testul transformarii limfoblastice ;
 - testul inhibitei macrofagelor ;
- teste *in vivo* – test de hipersensibilitate - prin injectare de antigene streptococice (corpusculare, SLO) - in caz de reactie pozitiva se observa o inflamatie (roseata).

***Streptococcus agalactiae* - grup serologic B**

– agent patogen care determina mastita bovina si astfel poate trece in secretia lactata, putând sa infecteze omul, in caz de consum de lapte nepasteurizat ; prezent si la ~ 25% dintre femei care sunt purtatoare ale acestui agent patogen in faringe, intestin sau vagin si pe care il pot transmite la nou-nascut in timpul nasterii ;

- la nou-nascut determina infectii respiratorii grave, meningite (1/3 din cazuri, alte 1/3 din cazuri fiind determinate de *E. coli*), septicemie neonatala ; transmiterea agentului patogen se face de la mama sau de la purtatori faringieni din spital ; infectiile produse au o mortalitate mare (50%);
- la femeia gravida poate determina: avort spontan, nastere prematura, febra puerperala, septicemii; dupa nastere, femeia prezinta bacteriurie ;
- la pacienti imunosupresati sau cu imunodeficiente poate determina infectii urinare, ale plagilor, ale articulatiilor, osteomielite, pneumonii, abcese periamigdalene endocardite.

Caractere de cultura si metabolice

S. agalactiae se caracterizeaza prin tipul de hemoliza α' - incompleta , pigmentogeneza pe mediu Columbia (pigment rosu caramiziu), cresterea pe medii cu concentratii mari de bila. Nu hidrolizeaza esculina la esculetina (spre deosebire de streptococii de grup D – *Enterococcus faecalis*, *S. bovis*). Alte caractere diferentiale : rezistenta la bacitracina si SXT.

Enterococcus faecalis – grup serologic D. Enterococii sunt bacterii Gram pozitive care apartin genului *Enterococcus sp.* si fac parte din microbiota intestinala normala. Inainte de identificarea tulpinilor de enterococi multirezistente la antibiotice la sfârșitul anilor '70, enterococii erau considerati bacterii relativ inofensive. Dupa doua decenii, enterococii au fost identificati ca agenti ai infectiilor nosocomiale, cu o frecventa in crestere si in paralel cu o dobândire a rezistentei la majoritatea substantelor antibiotice utilizate (in ultimul deceniu lumea medicala a fost alarmata de emergenta enterococilor rezistenti la vancomicina), ceea ce restrânge mult optiunile medicilor clinicieni pentru conducerea tratamentului infectiilor determinate de acestia. Ca rezultat, enterococii au devenit agenti oportunisti, cauza unor infectii dificil de tratat. Majoritatea infectiilor se datoreaza mai ales speciilor de *Enterococcus faecalis* si in mai mica masura altor specii, cum ar fi : *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. avium*. Raportul dintre infectiile determinate de *E. faecalis* si cele cauzate de alte specii de enterococi este de 10:1. In plus, experimentele de conjugare au confirmat transferul genelor de rezistenta la vancomicina, de la enterococi la *S. aureus*. Rezultatele modeste obtinute in ultimul deceniu in prevenirea si controlul strategiilor pentru limitarea rezistentei la vancomicina (ca si a rezistentei la metilicina la stafilococi), au reliefat dificultatea problemei, odata aparuta.

Diagnosticul de laborator al infectiilor streptococice

- bacteriologic :

- se bazeaza pe izolarea agentului patogen din produsele patologice si examinarea unor caractere de cultura, morfologice si biochimice (vezi Anexe I- IV) :
- examinarea caracterelor de cultura pe medii lichide si solide ; pe geloza-sânge se determina caracterele de colonie si tipul de hemoliza;
- examenul microscopic al frotiurilor efectuate din culturi pe mediu lichid, colorate Gram : bacterii Gram pozitive, grupate in lanturi ,
- testul catalazei – efectuat pe lama sau in tub (nu se face pe culturi in placi cu geloza-sânge);

- testul cresterii pe medii cu 6,5% NaCl - util identificarii enterococilor care sunt halotoleranti (*E. faecalis*) ; celelalte specii de streptococi nu cresc pe acest mediu ;
- testele diferentiale de sensibilitate la bacitracina si SXT (sulfametoxazol trimetoprim)
 - streptococii β -hemolitici din grupul serologic A sunt sensibili la bacitracina (ϕ zonei de inhibitie a cresterii > 10 mm) si rezistenti la SXT, iar cei din serogrupurile C, F, G sunt rezistenti la bacitracina (rezistenta nativa) si sensibili la SXT;
- testul la optochin – *S. pneumoniae* este sensibil la optochin care determina o zona de inhibitie a cresterii > 14 mm ;
- tehnici moderne: galerii de identificare biochimica tip API (BioMérieux) - API 20 Strep, Rapid ID 32 Strep System (disponibile si in tara noastra); metode moleculare.

- imunologic :

- reactii de latex – aglutinare ;
- determinarea serogrupului cu ajutorul trusei Streptococcus ABCG (produsa de I. Cantacuzino) sau cu *Slidex Strep kit* (BioMérieux);
- testul ASLO (titru semnificativ > 200 U.H.)
- teste imunoenzimice (ELISA).

S. agalactiae (grup serologic B)

- hemoliza α' - incompleta - testul CAMP- de evidentiare a *CAMP-factorului* (proteic)- realizat prin insamantarea in striuri perpendiculare a tulpinii de streptococ de testat si a unei tulpini de stafilococ producator de β - toxina (hemoliza cald-rece); streptolizina actioneaza sinergic cu β -hemolizina stafilococica (hemoliza incompleta) si determina o hemoliza totala in forma de sageata (fig. 15);

- pigmentogeneza- insamantare pe geloza Columbia -colonii pigmentate in rosu-caramiziu ;

- cresterea pe medii cu concentratii mari de bila ;
- testul hidrolizei esculinei - nu hidrolizeaza esculina la esculetina (spre deosebire de streptococii de grup D – *S. bovis*) – esculina + Fe din mediu – determina innegrirea coloniilor si a mediului de cultura in jurul lor ;
- testarea sensibilitatii la antibiotice : rezistenta la bacitracina si SXT.

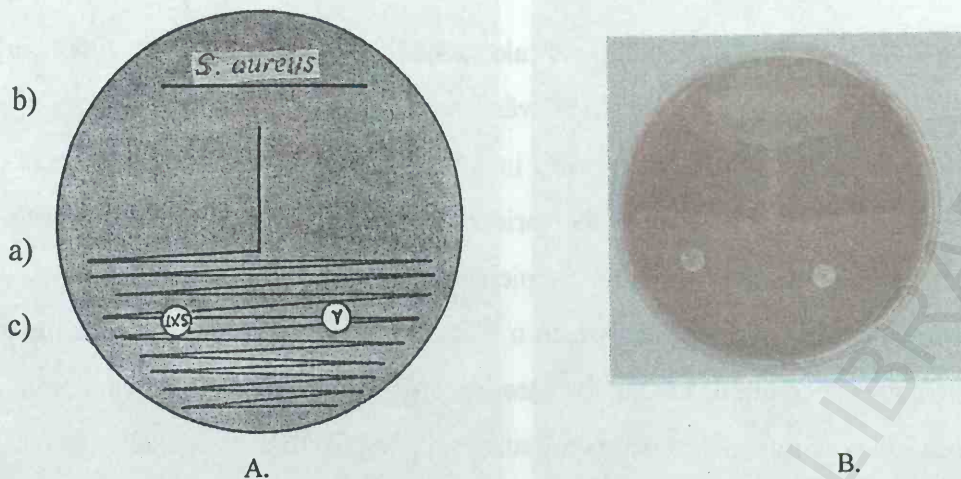


Fig. 15. A. Tehnica de insamantare a gelozei-sange pentru realizarea testului CAMP si a testelor de sensibilitate la bacitracina si SXT (sulfametoxazol trimetoprim); a) tulpina de testat este insamantata cu ansa in striuri in zig-zag (pe ~ 40% din suprafata placii), care se termina intr-un striu unic care coboara; b) perpendicular pe acest striu al tulpinii de testat, se insamanteaza in striu unic, de asemenea, o tulpina de *Staphylococcus aureus*, distanta dintre cele doua striuri trebuind sa fie de 1 cm; c) pe suprafata insamantata in striuri in zig-zag cu tulpina de testat, se plaseaza discuri diferentiale de bacitracina si SXT.

B. Test CAMP pozitiv, caracteristic speciei *Streptococcus agalactiae*, care produce o zona de hemoliza totala in forma de sageata, la zona de intalnire a striului pe care a fost insamantata, cu striul pe care s-a insamantat *S. aureus*.

BACILI GRAM POZITIVI

Dintre genurile de bacili Gram pozitivi, patru genuri sunt importante din punct de vedere medical:

- Bacillus* sp. - bacili formatori de spori
- Clostridium* sp. - " " " (Va fi tratat in capitolul "Bacterii anaerobe")
- Corynebacterium* sp. - bacili neformatori de spori
- Listeria* sp. - " " "

Bacillus sp.

Dintre speciile acestui gen, doua specii sunt mai importante din punct de vedere medical: *B. anthracis* si *B. cereus* (in mai mica masura si specia *B. subtilis*, care poate fi un contaminant al culturilor si care poate determina bacteriemie tranzitorie la pacientii care fac hemodializa, situatie care poate sa apara datorita contaminarii aparatului cu care se realizeaza aceasta procedura).

Bacillus anthracis este agentul patogen al unei boli grave, mortale, numita antrax (carbune sau dalac), bola comuna la animale si rara la om. Este un bacil Gram pozitiv de dimensiuni mari, cu capete drepte, celulele fiind grupate adesea in lanturi (fig. 16). Sunt germeni

imobili (spre deosebire de celelalte specii ale genului), capsulati, capsula fiind compusa din D-glutamat (caracter unic printre bacterii) si având un puternic efect antifagocitar.

Se transmite prin spori, care rezista in sol ani de zile. Omul se poate infecta prin spori sau produse animale (piele, blana, lâna) sau prin contact cu animale bolnave. Poarta de intrare in organismul gazdei poate fi reprezentata de piele, mucoase si tractul respirator.

Patogenie. *Bacillus anthracis* este o bacterie foarte agresiva, care are un efect letal prin capacitatea mare de multiplicare si formarea de trombusuri ce astupa capilarele, determinând fenomene de hipoxie, ischemie si necroza tisulara, dar si prin toxinogeneza.

Agentul patogen invadeaza gazda si produce toxina specifica, cu trei componente: 1) factorul "edem", 2) antigenul protector si 3) factorul letal. Factorul "edem" este o adenilat-ciclaza care necesita factor protector pentru a patrunde in celulele umane. Adenilat-ciclaza bacteriana creste concentratia de AMPc in celula, determinând pierderea ionilor de clor si a apei si aparitia edemului in tesuturi. Factorul letal este o proteaza care cliveaza o fosfokinaza necesara pentru transmiterea semnalului in calea care controleaza cresterea celulara. Pierderea fosfokinazei conduce la inhibarea cresterii si moartea celulara consecutiva. Leziunea tipica este o ulceratie neagra, cu crusta, numita "pustula maligna". Cazurile netratate evolueaza spre bacteriemie si moarte. Antraxul pulmonar este o forma de pneumonie cauzata de inhalarea sporilor de catre lucratori din industria de prelucrare a lânii. Antraxul gastrointestinal se produce ca rezultat al ingerarii de carne contaminata.

Diagnosticul de laborator. Examenul microscopic al produsului patologic. Pe frotiuri efectuate din leziuni se observa bacili de dimensiuni mari, Gram pozitivi, grupati in lanturi. De obicei, sporii nu pot fi observati pe frotiurile efectuate din produsul patologic. Bacilii pot fi cultivati in conditii aerobe, pe geloza nutritiva sau pegeloza-sânge ; formeaza colonii de tip "R", opace, cu margini ondulate. Pe mediu cu gelatina are o crestere arborescenta.

Pentru identificarea acestui agent patogen nu sunt utile testele serologice.

Penicilina G este antibioticul de electie in tratament. Nu au fost izolate tulpini rezistente .

Prevenirea contaminarii solului se face prin sterilizarea animalelor moarte si a produselor animale din zonele cu infectii endemice.

Bacillus cereus

Bacillus cereus este un bacil Gram pozitiv, celulele cu capete rotunjite fiind grupate in lanturi (fig. 17). Este un bacil formator de spori, care poate determina o intoxicatie alimentara cu doua forme distincte, ambele datorate enterotoxinelor produse. Prima forma este cea a unui sindrom diareic cu o perioada de incubare lunga - 18 ore si se manifesta prin diaree apoasa,

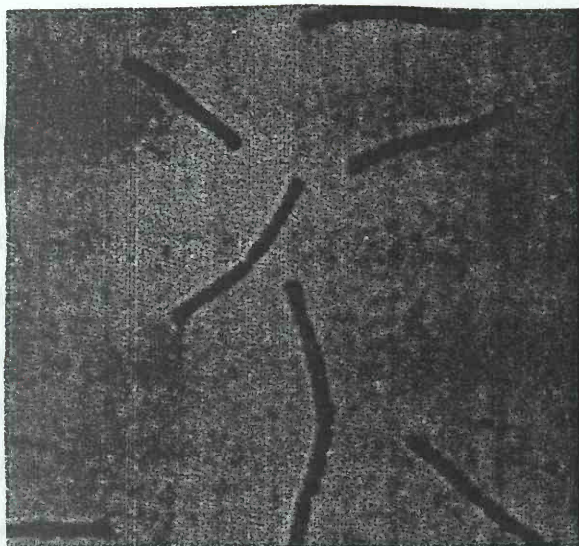


Fig. 16. *Bacillus anthracis* izolat dintr-o plaga a piciorului. Bacili Gram pozitivi, cu capete taiate drept, grupati in lanturi scurte (marire: x 1000).

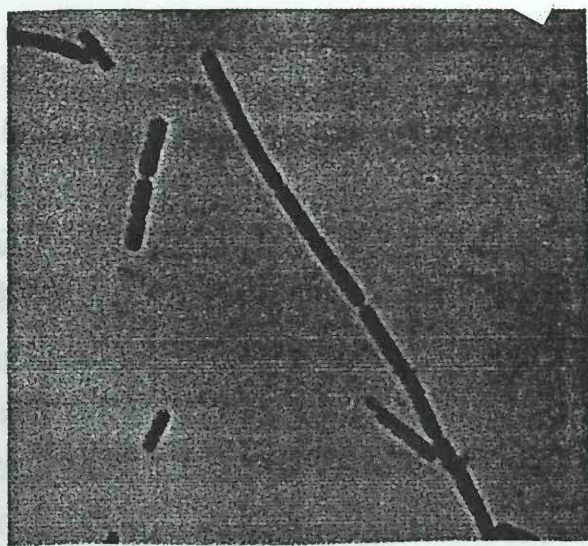


Fig. 17. *Bacillus cereus* izolat dintr-o plaga a gambei. Bacili Gram pozitivi, cu capete taiate drept, grupati in lanturi (marire : 1000X).

nesanguinolenta si dureri abdominale, semanând cu gastroenterita clostridiana. Cealalta forma este cea a unui sindrom emetic, cu o perioada de incubare scurta – 4 ore si se manifesta prin greata si vomismente substantiale (asemanator cu efectele enterotoxinei stafilococice), frecvent asociate cu consumul de orez (fiert sau copt). In ambele forme nu este prezenta febra si in majoritatea cazurilor se produce vindecarea spontana in 2 zile. Intoxicatia se datoreaza unei contaminari masive (1 milion de germeni/g produs) a alimentelor (orez, paste fainoase) cu spori de *Bacillus cereus*, termorezistenti.

Sporii de pe semintele cerealelor, cum ar fi orezul mai ales, supravietuiesc tratamentului termic rapid. Sporii germineaza când alimentele sunt pastrate calde timp de mai multe ore. In aceste conditii, celulele vegetative produc toxine, care vor patrunde in tractul digestiv al gazdei care ingereaza alimentul respectiv. *B. cereus* sintetizeaza 2 enterotoxine. Modul de actiune al enterotoxinei care determina forma diareica de intoxicatie este similar cu cel al toxinei holerice. Mai precis, toxina actioneaza prin ADP-ribozilare asupra proteinei G, care stimuleaza adenilat ciclaza si determina cresterea concentratiei de AMPc in enterocite. Modul de actiune al celeilalte enterotoxine – care determina forma emetica este asemanator cu modul de actiune al enterotoxinei stafilococice, având deci activitate de “superantigen” (vezi enterotoxina stafilococica).

Diagnosticul de laborator de obicei nu se face. Tratamentul este doar simptomatic, iar prevenirea nu se face prin metode specifice, ci prin evitarea consumului de alimente (orez fiert sau copt in special) pastrate mult timp la cald, care pot contine enterotoxine.

***Corynebacterium* sp.**

Bacteriile incadrate in acest gen sunt bacili Gram pozitivi, neacidoalcoolorezistenti, neramificati, imobili (cu exceptia *C. aquaticum*), aerobi si facultativ anaerobi, neacidorezistenti; majoritatea speciilor fermenteaza glucoza si alte zaharuri si sunt catalazo-pozitive. Sunt bacili nesporulati, necapsulati, frecvent nehemolitici.

In editia din 1986 a manualul Bergey, Genul *Corynebacterium* era prezentat ca un grup heterogen de bacterii, care necesita revizuire.

In ultimul deceniu, taxonomistii au redefinit genul *Corynebacterium* pentru a-l restrânge la specii cu anumite particularitati: prezinta un perete celular aparținând chemotipului IV, in structura caruia este prezent acidul mezodiaminopimelic (*mezo* - *DAP*), arabinoza, galactoza, manoza, acizi micolici (cu lanturi continând intre 22 si 36 atomi de carbon, numiti si *acizi corinomicolici*), acizi grasi saturati si mononesaturati, menachinone dehidrogenate (o forma de vitamina K bacteriana) si care au un continut in G - C de ~ 51 - 68 moli %. Prezenta acizilor micolici demonstreaza inrudirea genului *Corynebacterium* cu genurile *Mycobacterium*, *Nocardia* (din grupul actinomicetelor), deosebirile constând in numarul diferit al atomilor de carbon din lanturile acizilor micolici. Genul contine anumite specii care nu corespund noilor criterii, fiind necesara reclasificarea lor.

Rezultate ale studiilor filogenetice bazate pe analiza secventelor ADN pentru moleculele de ARNr 16S, au demonstrat ca genul *Corynebacterium* este inrudit cu urmatoarele genuri, importante din punct de vedere medical: *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* si s-a sugerat incadrarea lui in Fam. *Mycobacteriaceae* si reclasificarea anumitor specii:

Corynebacterium haemolyticum $\Rightarrow$ *Arcanobacterium haemolyticum*;

Corynebacterium pyogenes $\Rightarrow$ *Actinomyces pyogenes*;

Corynebacterium equi $\Rightarrow$ *Rhodococcus equi*;

Corynebacterium minutissimum - organism din grupul CDC-JK $\Rightarrow$ *C. jeikeium*.

Clasificarea corinebacteriilor dupa habitat si patogenitate:

- specii patogene pentru om si animale;
- specii patogene pentru plante;
- specii nepatogene.

Semnificatie medicala. Specia tip a genului, patogena pentru om este *Corynebacterium diphtheriae* care determina *difteria*, boala infecto-contagioasa, din grupul A (cu gravitate mare). Alte specii patogene: *C. minutissimum* - agentul patogen al eritrasmei pielii (dermatitoza); *C. mycoides* - determina ulcere ale pielii, in zonele tropicale;

Difteria este cunoscută încă din antichitate ca o boală a gâtului transmisibilă la copii, dar a fost descrisă pentru prima dată ca entitate clinică în 1826, de către patologul Pierre F. Bretonneau, care a denumit boala "difterită", termen derivat de la cel grecesc pentru "membrana", fiind o referire la membranele care apar în gâtul pacientului. În 1883, Edwin Klebs a observat bacteria în materialul recoltat din gâtul unui pacient. În anul următor, Fr. Löffler a cultivat pentru prima dată bacteria pe ser bovin coagulat, folosit și azi pentru culturile stoc. Löffler a reprodus experimental boala, dar nu a descoperit agentul patogen în leziuni. A tras astfel concluzia că boala nu este determinată de agentul patogen direct, ci de un produs de secreție al acestuia, ceea ce a fost confirmat ulterior de către Roux, care a demonstrat că filtratul culturii bacteriene determină leziunile caracteristice bolii, care este o toxemie. Bacilul numit inițial Klebs – Löffler (*Bacillus diphtericum*) a primit în 1896 (Leman și Newman) numele științific de *Corynebacterium diphteriae*, deoarece grupările de celule se aseamănă unui "club" (gr. *coryne* = club) și formează membrane.

Corynebacterium diphteriae se prezintă sub forma unor bacili drepti sau incurbați, cu dimensiuni de $0,3 - 0,8 \mu\text{m}$ / $3 - 8 \mu\text{m}$, frecvent maciucati sau în forme ovoide, coccoidale (mai ales când frotiul se face de pe geloza-sânge), neomogen colorate. Sunt bacterii Gram pozitive (la limita) care conțin numeroase granule metacromatice citoplasmice evidențiate printr-o colorație specială (pentru incluzii de volutina). Bacteriile rămân aproape unele de altele după multiplicare, dispuse în unghiuri ascuțite (~ litere chinezești) sau sub forma de palisade (fig. 18). Aceste caractere tinctoriale și morfologice sunt patognomonice, fiind utile identificării.

Agentul patogen se transmite pe cale aerogenă, prin inhalare de picături Pflügge eliminate de bolnavi de difterie. Infecția se localizează în tractul respirator superior, în vecinătatea amigdalelor. *C. diphteriae* este tipul de agent patogen cantonat la poarta de intrare: – în falsele membrane, când poarta de intrare este rinofaringele; în secreția oculară – în difteria oculară; în secreția vulvară – în difteria genitală. La animale – câini, pisici – care sunt purtători naturali ai agentului patogen, nu s-au citat cazuri de difterie.

Bacteriile produc o exotoxină puternică (după toxina botulinică și tetanică) care interferează cu sinteza proteică în celulele epiteliale care mărginesc pielea și cavitățile corpului, inclusiv tractul respirator. Tesutul mort și mucusul se acumulează, împreună cu leucocite, material fibros, formând pseudomembrane ("pseudo" pentru că nu corespund definiției unei membrane adevărate). Se produce blocajul respirator (asfixia), febra, adenopatie și moartea poate surveni, mai ales la copii; la adulți, adesea toxina difuzează pe cale circulatorie în organism, determinând leziuni cardiace și distrucția invelisului gras din jurul nervilor. În 1929 Ramon a obținut anatoxina difterică, supunând toxina acțiunii combinate a formolului și caldurii. Anatoxina este folosită și în prezent pentru a realiza

profilaxia difteriei, prin vaccinare (cu trivaccinul DiTePer la vârsta de 3 ani; se face un rapel la 4 și 6 ani cu bivaccinul DiTe; monovaccinul ADPA se administrează după 16 ani, la cei scapați de la vaccinarea din copilărie). În 1961, V. J. Freeman a descoperit un virus integrat în cromozomul bacterian, care codifica producerea exotoxinei, virus numit "corinefag" și care se afla în relație de lizogenie cu bacteria gazdă. Tulpinile bacteriene nelizogene nu sunt virulente, dar pot deveni ca urmare a infecției virale.

Specii patogene la animale: *C. pseudotuberculosis (ovis)*, *C. ulcerans*, *C. equi* – aceste specii pot deveni patogene pentru om (datorită toxinelor produse), fiind specii oportuniste la bolnavii de SIDA. *C. ulcerans*, un patogen obișnuit al bovinelor, poate da faringită exudativă sau ulcere ale mâinilor la om. Există și cazuri de difterie, pentru că produce două toxine, una fiind asemănătoare cu toxina difterică, iar cealaltă cu toxina produsă de *C. ovis*; această specie poate determina la om limfadenita granulomatoasă acută și pneumopatii cu eozinofilie. Nu sunt citate cazuri de difterie cu *C. ovis*.

Corinebacteriile nepatogene, numite difteromorfi, au o morfologie și caractere tinctoriale asemănătoare cu bacilul difteric. Pot fi incriminate în infecțiile oportuniste, la bolnavii de SIDA. *C. hoffmani* este specie prezentă în microbiota normală a rinofaringelui, putând fi agentul cauzal al unor infecții urinare la bolnavii cu transplant renal sau al unor endocardite postchirurgicale, după operații pe valvulele cardiace. *C. xerosis* este un difteromorf al rinofaringelui și pielii și un posibil agent cauzal al pneumoniei la bolnavii neoplazici. Difteromorfi prezenti pe tegumente (grupul JK) constituie cauza a 20 – 30 % din infecțiile nosocomiale. Este foarte importantă diferențierea și diagnosticul corect.

Caractere de sensibilitate. Bacilul difteric este sensibil la căldura umedă, fiind omorât în 10 minute, la 60°C; este mai rezistent la uscăciune, în întuneric (așa se pastrează tulpinile stoc, pe mediu Löffler). Rezistă 5 zile în lapte, luni de zile pe obiecte contaminate, cu păstrarea caracterului patogen. Este sensibil la antibioticele uzuale (eritromicina, penicilina), mai puțin sensibil la oxacilina; este distrus de antiseptice uzuale.

Tratamentul difteriei necesită atât antibiotice, cât și antitoxina pentru a neutraliza toxina. În prezent, boala este ținută sub control, cazurile de difterie fiind sporadice: în S.U.A. – se înregistrează ~10-12 cazuri anual, dar rămâne o problemă de sănătate în Asia; în Europa se înregistrează un număr de aproximativ 800 – 900 cazuri anual, majoritatea în fostele țări ale Uniunii Sovietice și Turcia; de exemplu, în 1995 în 13 din cele 14 țări ale U.S. s-au înregistrat 50.000 îmbolnăviri, dintre care 2000 mortale. La noi în țară incidenta de 1 – 2 cazuri /an se datorează greselilor de vaccinare sau apar în colectivități mari cu copii scapați de la vaccinare. Deși se tinde spre eradicarea acestei boli.

cunostintele despre aceasta boala sunt necesare, pentru recunoasterea ei in teren si diagnosticul de laborator.

Diagnosticul de laborator

- diagnostic bacteriologic

Izolarea germenului in stare pura de la purtatorii de tulpini toxigene trebuie sa fie urmata obligatoriu de sterilizarea focarului. Tulpinile izolate se identifica pe baza caracterelor morfotinctoriale, culturale, biochimice:

- efectuarea de frotiuri care se coloreaza Gram; examinarea la microscopul optic cu obiectivul de imersie permite observarea de : 1) *corinebacterii* - bacili Gram pozitivi (la limita), frecvent maciucati sau in forme ovoid-cocoidale (mai ales când frotiul se face de pe geloza-sânge), neomogen colorati; sunt bacterii care contin incluzii metacromatice citoplasmatiche evidentiata prin coloratia speciala pentru incluzii de volutina ; bacteriile pot fi grupate in palisade sau dispuse in unghiuri ascutite (~ litere chinezești) (fig. 18); aceste caractere tinctoriale si morfologice sunt patognomonice, fiind utile identificarii ; 2) *difteromorfi* - se observa bacterii Gram pozitive, filamentoase, ramificate, care dovedesc apartenenta la grupul actinomicetelor (fig. 19).

- genul *Corynebacterium* cuprinde specii care difera prin caracterele biochimice, cum ar fi: lichefierea serului bovin coagulat (mediu Löffler), lichefierea gelatinei, hidroliza esculinei;
- speciile *C. diphtheriae*, *C. ovis*, *C. ulcerans* produc cistinaza si elibereaza H_2S - difteromorfii nu produc; identificarea biochimica se poate face cu ajutorul sistemului *API Coryne*.
- *C. diphtheriae* nu produce ureaza ; *C. ulcerans*, *C. ovis* sunt ureazo-pozitive; difteromorfii +/- ;
- teste de fermentare a zaharurilor, teste de patogenitate.

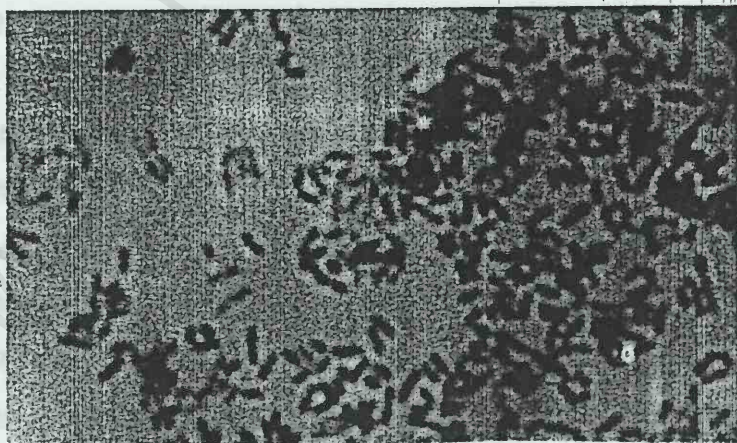


Fig. 18. Imagine microscopica a unor celule de *Corynebacterium* sp. pe frotiu colorat Gram in care se observa bacili Gram pozitivi, grupati in palisade (marire: x2500).

- **diagnostic imunologic**

- prin hemaglutinare pasiva (H.A.P.), test care permite si evaluarea nivelului seroprotectii postvaccinale;
- **tipizarea fagica** si cu ajutorul **bacteriocinelor**, a tulpinilor izolate;
- determinarea sensibilitatii la antibiotice prin tehnica antibiogramei.



Fig. 19. Imagine la microscopul optic al diferomorfilor; se observa bacterii filamentoase, ramificate, care dovedesc apartenenta la grupul actinomicetelor (marire: x 2500).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes este un bacil de dimensiuni mici, Gram pozitiv. Intr-o perioada aceasta bacterie era considerata „Cenusareasa” bacteriilor patogene, datorita faptului ca proprietatile sale de patogenitate nu erau unanim recunoscute. Acest bacil este prezent in mod obisnuit in sol, ca si in microbiota multor animale, intre care bovine, rozatoare si animale de casa cu blana. Se transmite omului prin contact cu solul, ca si prin consum de alimente de origine animala, dar mai ales de brânzeturi.

Bacili sunt grupati in literele „V” sau „L”, asemanatori corinebacteriilor (fig. 20). Sunt neobisnuit de mobili, prin miscari de rostogolire, ceea ce-i deosebeste de corinebacterii, care sunt imobile. Coloniile dezvoltate pe geloza-sânge sunt inconjurate de o zona ingusta de β -hemoliza, asemanatoare cu cea produsa unii streptococi. Este agentul patogen al meningitei si septicemiei la nou-nascuti si adulti imunocompromisi. Poate determina si gastroenterite febrile.

Patogenie. Listerioza poate avea mai multe forme:

- Meningita listerica - se caracterizeaza prin cefalee, rigiditatea gâtului, delir si coma;
- Listerioza sistemică - se insoteste de un numar mare de *monocite* in sângele periferic (de unde deriva denumirea speciei);
- Infectia uterului, insotita de discrete simptome *influenza-like*; daca infectia este contractata in timpul sarcinii, boala poate determina avort spontan sau tulburari ale dezvoltarii mentale la nou-nascut.

Infectiile cu *Listeria* se produc mai ales in doua moduri: 1) infectii ale fatului sau ale nou-nascutului, datorita transmiterii transplacentare sau in timpul nasterii a agentului patogen; 2) infectii ale adultilor imunocompromisi, in special ale pacientilor cu transplant de rinichi. Listeriile sunt prezente la animale, plante, sol. Din aceste rezervoare de infectie, listeriile sunt transmise omului prin contactul cu animale si excretele lor, prin lapte nepasteurizat si vegetale contaminate. Caracterul patogen al listeriilor este dependent de capacitatea acestor bacterii de a invada fagocitele mononucleare. Deoarece cresc preferential intracelular, imunitatea mediata celular este mai importanta in aceste infectii decât cea mediata umoral. Astfel, supresia imunitatii mediate celular predispune la infectii cu listerii. Infectia cu *L. monocytogenes* se propaga de la o celula la alta prin intermediul filamentelor de actina, care se contracta si propulseaza bacteria prin membrana, spre celula invecinata. Un factor important de virulenta este *listeriolizina O*, o citolizina/ hemolizina similara streptolizinei O, care actioneaza prin degradarea membranelor celulare.

Infectiile in timpul sarcinii (asimptomatice sau manifestându-se ca o stare gripala) pot evolua spre avort, nastere prematura sau septicemie in perioada *peripartum*. Nou-nascutul infectat in timpul nasterii poate face meningita dupa 1 – 4 saptamâni. Infectiile adultilor imunocompromisi: meningita, septicemie.

L. monocytogenes poate determina si gastroenterite, manifestate prin diaree apoasa, febra, cefalee, mialgii, crampe abdominale (+/- vomismente); de obicei sunt o consecinta a consumului de produse lactate contaminate, dar si produsele de carne (de ex. *hot-dog*) insuficient tratate termic pot fi implicate. Prevenirea infectiilor este dificila, deoarece organismul nu se imunizeaza, astfel ca este recomandata doar limitarea expunerii indivizilor imunocompromisi la sursele potentiale de infectie (animale infectate si produsele lor, vegetale contaminate). Listerioza nu este o boala transmisibila printre indivizii umani. Tratamentul prompt si prelungit cu antibiotice, cum ar fi tetraciclina, este eficient, dar recaderile sunt frecvente. Infectiile netratate pot avea

sfârșit letal. Tratamentul infecțiilor invazive se face cu ampicilina +/- gentamicina. Tulpinile rezistente sunt rare. Gastroenteritele cu *Listeria*, de obicei, nu necesita tratament.

Diagnosticul de laborator. Se face de obicei microscopic, prin examinarea frotiurilor colorate Gram si prin cultivare. La microscop listeriile apar ca bacili Gram pozitivi, asemanatori cu difteroizii (fig. 20). Pe geloza-sânge dezvolta colonii mici, gri, cu o zona ingusta de β -hemoliza. Izolarea unei listerii este confirmata de mobilitatea bacteriilor, care le diferentiaza de corinebacteriile imobile. Identificarea se face pe baza testelor de fermentatie a zaharurilor. Este disponibil si sistemul microtest *API Listeria* (BioMérieux).

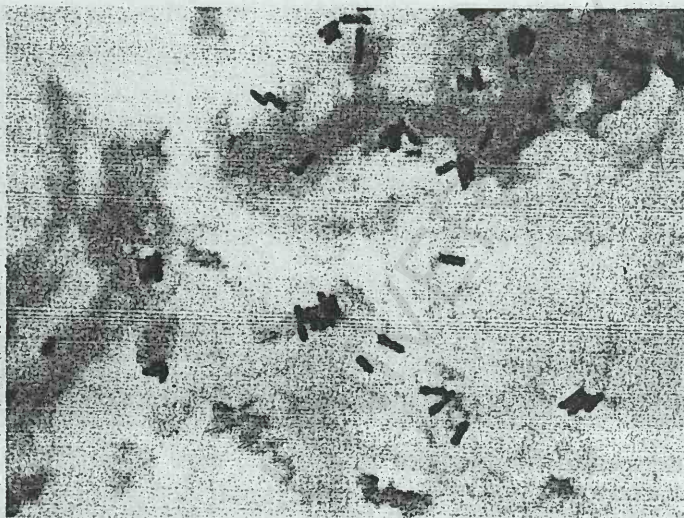


Fig. 20. *Listeria monocytogenes*. Imagine microscopica a unor bacterii Gram Pozitive, grupate în forma literelor L si V, ca si în palisade, asemnator Corinebacteriilor (marire: x 1000).

BACILI GRAM POZITIVI FILAMENTOSI

Incadrare taxonomică: Cls. *THALLOBACTERIA* (*Actinobacteria* = *Actinomycetes*)

Actinomycetes = ciuperci în forma de raze, într-o traducere *ad literam*, aceasta fiind denumirea initială a acestui grup, denumire datorată structurii de tip micelian a acestor microorganisme. În realitate, actinomicetele sunt eubacterii Gram pozitive, filamentoase, ramificate, cu structura de tip micelian, care se multiplică prin spori de propagare.

Confuzia cu ciupercile a provenit din faptul că s-a folosit aceeași terminologie, respectiv termenul de *tal* pentru ansamblul filamentelor ramificate și de *sporangii* și *spori* pentru organele de sporulație.

Prima descriere a acestor microorganisme i se datorează lui F. Cohn, care a izolat în 1875 din canalul lacrimal, o tulpină aparținând speciei *Septothrix foersti*. În 1877, Harz a izolat din leziuni cutanate ale bovinelor specia *Actinomyces bovis*.

Miceliul este reprezentat de o masă de filamente subțiri, ramificate, întretesute ca o păslă, fiind asemănător cu al ciupercilor inferioare (micromicete), între care au fost încadrate inițial, datorită unor însușiri morfo-fiziologice comune cu acestea dar care nu sunt esențiale pentru încadrarea taxonomică, cum ar fi: miceliu format din hife cu ramificații adevărate; formarea de spori de propagare (diseminare), spre deosebire de endosporii celorlalte eubacterii, care reprezintă o formă de diferențiere a celulei bacteriene vegetative, cu rol de rezistență în condiții nefavorabile de mediu.

Asemănarea cu bacteriile este însă fundamentală și se referă la: organizarea celulară de tip procariot: material nuclear liber în citoplasmă, nedelimitat de membrana nucleară (la *Streptomyces sp.* și *Mycobacterium avium*, *M. xenopi* – s-a descoperit existența de cromozomi și plasmide lineare cu secvențe proteice, numite *invertroni* la capătul 5' al moleculei de ADN, care este astfel protejată de acțiunea endonucleazelor – Picardeau și colab., 1998); lipsa mitozelor în procesul multiplicării; lipsa organelor membranare; structura peretelui celular- tipică bacteriilor Gram pozitive; lipsa chitinei, substanță omniprezentă în peretele celular al fungilor; existența unor specii cu metabolism respirator strict anaerob și a unor specii cu nutriție chimioautotrofă, caractere care nu sunt prezente niciodată la fungi; sensibilitatea la substanțe antibiotice antibacteriene și lizozim; sensibilitatea la bacteriofagi (=actinofagi).

Habitat. Actinomicetele reprezintă aprox. 30% din populația microbiană a solului, dintre care unele pot contamina și infecta omul și animalele. Specii saprotrofe se pot dezvolta și pe diferite produse alimentare, pe care le alterează și le imprimă un miros particular, de pământ, camfor sau fructe. Există specii comensale pe piele și mucoase, la om și animale și specii condiționat patogene.

Morfologie. Sunt organisme filamentoase, ramificate, hifele având un diametru mic (0,5 – 1, max. 2 μm), comparativ cu al micromicetelor, fiind neseptate și multinucleate. Filamentele prezintă o mare varietate de tipuri morfologice. Astfel, cele care se dezvoltă pe suprafața substratului formează miceliul vegetativ sau primar, pe suprafața acestuia aparând ramificații cu o morfologie particulară numite sporofori sau conidiofori, pe care se formează spori de propagare sau conidiile; aceste ramificații constituie miceliul secundar. Deși sunt bacterii Gram pozitive, unele (Fam. *Mycobacteriaceae*) sunt foarte greu colorabile prin această metodă și prezentând proprietatea de acidoalcoolorezistență - particularitate datorată unei structuri deosebite a peretelui celular al acestor bacterii (vezi Cap. Bacterii acidoalcoolorezistente).

Caractere de cultura. După însămânțare, culturile de actinomicete se dezvoltă lent, în 4 – 5 zile de incubare. Pe medii de cultura solide (mediul sintetic selectiv Gauze) actinomicetele

dezvolta colonii compacte si aderente la mediu, cu aspect uscat, cretos, in general nepigmentate, pentru ca desi sintetizeaza pigmenti, acestia sunt eliberati in mediu, fiind cromopare.

Caractere fiziologice. Toate speciile sunt aerobe, cu exceptia speciilor incadrate in Fam. *Actinomycetaceae* care pot fi aerobe, aerobe facultativ anaerobe si strict anaerobe. Folosirea numelui generic de *Actinomyces* a fost limitata de catre Wright la actinomicetele anaerobe, ceea ce a ramas valabil pâna azi. Speciile aerobe au fost incadrate in genurile *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces*. Actinomicetele au o nutritie heterotrofa, fiind omnivore datorita unui echipament enzimatic complex. Temperatura de dezvoltare: majoritatea speciilor sunt mezofile. Se dezvolta optim la valori ale pH-ului cuprinse intre 7 – 8.

Reproducerea se face pe cale asexuata, prin spori de propagare, cu diferite denumiri preluate din micologie. Sporii sunt sferici, ovalari sau cilindrici si spre deosebire de endosporul bacterian tipic, sporii actinomicetelor se pot evidentia prin coloratia simpla cu fucsina bazica.

Clasificare. Initial sistemele de clasificare erau bazate pe criterii exclusiv morfologice (miceliu, spori, sporofori) care prezinta insa o mare variabilitate, reflectând conditiile de mediu variate in care se dezvolta. Criteriile oferite de biologia moleculara: determinarea continutului in baze azotate al acizilor nucleici, stabilirea gradului de omologie a moleculelor de ADN pe baza testelor de hibridizare, confera un grad mai mare de obiectivitate sistemelor de clasificare. Sunt recunoscute in prezent trei grupe de actinomicete semnificative pentru patologia umana:

Fam. *Mycobacteriaceae* – va fi prezentata in **Cap. Bacterii acidoalcoole rezistente**

G. Mycobacterium

Fam. *Actinomycetaceae*

G. Nocardia

G. Actinomyces – grupeaza exclusiv specii strict anaerobe;

G. Micromonospora

Fam. *Streptomycetaceae*

G. Streptomyces

Patogenie. Specii ale genurilor *Nocardia*, *Actinomyces* pot determina infectii viscerale, mai ales pulmonare - de ex., *Nocardia sp.*, prezenta in tartrul dentar, a fost izolata din lichidul pleural. Specii de *Nocardia sp.* (*N. asteroides*, *N. brasiliensis*) produc mai frecvent infectii ale membrilor inferioare (2/3 din cazuri), numite micetoame (mai ales in zonele tropicale) deoarece sunt asemanatoare cu infectiile micotice (un alt motiv de confuzie cu ciupercile), dar mai distructive si cu o evolutie mai rapida decât acestea. Alte localizari: pielea capului, ceafa, torace, umeri, brate, in general orice zona descoperita si contaminata cu sol (praf) a unor leziuni mecanice preexistente. La inceput apar unul sau mai multi noduli, care se maresc, conflueaza, se ulcereaza eliminând un lichid purulent sau serosanguinolent, apoi invadeaza muschii si oasele,

care sunt distruse. Bolnavul are dureri, prurit, senzația de arsură și în cele din urmă devine infirm (piciorul de Madura). Pot apărea și metastaze viscerale sau cerebrale fatale. Perioada de incubatie a bolii este de săptămâni sau ani de zile, evoluția este cronică și fără vindecare spontană. Prognosticul este bun, cu excepția metastazelor viscerale. Tratamentul etiologic se face cu streptomicină, rifampicină.

Nocardia minutissima (reincadrat și denumit în prezent *Corynebacterium minutissimum*) determină afecțiuni cutanate la nivelul pliurilor, asemănătoare eczemelor.

Speciile de *Actinomyces* sunt anaerobe și comensale ale cavităților naturale la om și animale (mamifere); niciodată izolate din sol, aceste specii pot fi condiționat-patogene, fiind agenții actinomicozei cervicofaciale la om și animale. Această localizare cervicofacială și cerebrală este predominantă (50% din cazuri), urmată de localizarea abdominală (apendice perforat, ulcer perforat), toracală (pleurezie) și alte localizări mai puțin frecvente. Infecțiile provocate sunt puțin contagioase, în mod asemănător cu cele provocate de alte bacterii strict anaerobe. Dezvoltarea bacteriilor și infecția consecutivă este favorizată de:

- contuzii ale țesuturilor, cum sunt cele provocate de extracțiile dentare și fracturi ale maxilarului;
- stază la nivelul canalelor excretorii, provocată de ex. de litiază renală;
- prezența altor germeni anaerobi (de ex. fuzobacterii și spirochete);
- corticoterapie, care determină un efect de imunosupresie.

Infecția se poate extinde în țesuturile și organele vecine prin contiguitate, ca și pe cale sanguină (nu și pe cale limfatică). O reacție de scleroză a țesuturilor învecinate limitează propagarea infecției, dar favorizează supraviețuirea germenilor datorită mediului anaerob creat și limitării patrunderii antibioticelor. Procesul de necroză apărut în interiorul unei leziuni deja sclerozate, conduce la formarea unui abces și explică recidivele, necesitatea unor tratamente prelungite cu antibiotice și de multe ori a unei intervenții chirurgicale.

Actinomyces israelii (*A. bovis*) este o specie prezentă pe dinții cariati, ca și în criptele amigdalene, constituind focare inflamatorii cronice. Poate determina leziuni subcutanate ale regiunii cervico-faciale și fistule ale acestora, prin care se elimină granule galbene sau albicioase (germeni înglobați într-un depozit lipidic provenit din țesuturile gazdei). Alte localizări: respiratorie, digestivă, genitală, rinichi, ficat, oase, glande lacrimale, sistem nervos central. Tratamentul etiologic se face cu penicilină.

Speciile genurilor *Micromonospora*, *Dermatophilus* pot determina infecții cutanate care afectează părul, inclusiv la animalele producătoare de lână.

Streptomyces madurae, *S. somaliensis* determina micetoame la om.

Tropheryma whippelii - determina maladia lui Whipple care este o infectie bacteriana sistematica, cu predominanta digestiva, dar si cu tulburari neurologice si cu evolutie cronica. Agentul patogen este o bacterie Gram pozitiva, bacilara, cu dimensiuni care variaza in limitele 1,5 – 2,5 μm / 0,2 μm , necultivabila pe culturi de celule si tesuturi, dar cu crestere intracelulara *in vivo* in macrofage, polimorfonucleare, fagolizozomi, enterocite, celule endoteliale, celule musculare netede, plasmocite, mastocite, limfocite intraepiteliale.

Este intrudita cu actinomicetele – caracter stabilit prin metode moleculare (tehnica PCR – amplificarea genelor pentru ARN 16 S de la bacteriile prezente in tesutul infectat, a permis identificarea acestei bacterii in 1992). Prima descriere a bolii a fost consemnata in 1907, de catre G Hoyt Whipple, la o pacienta cu poliarterita migratoare, tuse, diaree cronica, malabsorbtie, pierdere in greutate, adenopatie mezenterica, cu evolutie letala in timp de mai multi ani. In 1952 s-a consemnat primul caz vindecat cu streptomicina (tratament de lunga durata).

Poarta de intrare este digestiva, agentul patogen multiplicându-se in duoden si intestinul subtire. Se produce o infiltrare a stratului profund al mucoasei (*lamina propria*) cu macrofage PAS + (*periodic acid-Schiff*) si diseminarea bacteriilor in ganglionii limfatici mezenterici, in sânge si tesuturi (sistem nervos central, cord, membrane sinoviale, muschi netezi, ochi). Semnele caracteristice acestei boli sunt: sindrom de malabsorbtie (cu diaree cronica cu steatoree, dureri abdominale, pierdere in greutate, stare subfebrila), sindrom articular polimorf (simple artralгии, artrite migratoare, reumatism) care pot preceda semnele digestive, atingeri seroase (pleurezii, pericardita), atingeri cardiovasculare (endocardita lenta, miocardita, arterite), atingeri ale sistemului nervos central (tulburari psihice si dementa, ataxie, pareze, oftalmoplegie, surditate) si alte semne (cutanate, hepatice, ganglionare).

Diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de actinomicete

- prelevare de produs patologic din leziuni sau colectii;
- examenul direct pe preparate L/I a produsului patologic;
- izolarea in cultura pura a actinomicetelor:
 - **aerobe**
 - pe mediu Sabouraud (geloza glucozata), la pH neutru sau slab alcalin;
 - frotiuri colorate prin metoda coloratiei simple cu fucsina bazica sau coloratii diferentiale (Gram sau Ziehl-Nielsen);
 - la examenul microscopic – se evidentiaza bacterii filamentoase (de ex. *Nocardia* sp. - fig. 21);

acest examen este de multe ori insuficient, deoarece se distruge organizarea si morfologia

sporoforilor, astfel ca se apeleaza la efectuarea de culturi pe lame (lame imersate in mediu de cultura agarizat, topit si care se insamanteaza dupa solidificarea mediului in striuri paralele si se incubeaza la termostat intr-o camera umeda) si examinarea microscopica a acestora;

- **anaerobe**

- pe mediu pentru anaerobi (vezi Bacterii anaerobe), cu adaos de ser si sânge, acesta din urma pentru evidentierea capacitatii hemolitice a agentului patogen izolat; identificare biochimica, cu ajutorul sistemului API 20A (pentru anaerobi);
- specia tip: *Actinomyces israelii* – la examenul microscopic se observa celule ramificate (asemanatoare diferomorfilor), cu aspect de „ramuri de copac” (fig. 22); pe mediu de cultura solid formeaza colonii in forma de dinte molar (fig. 23).

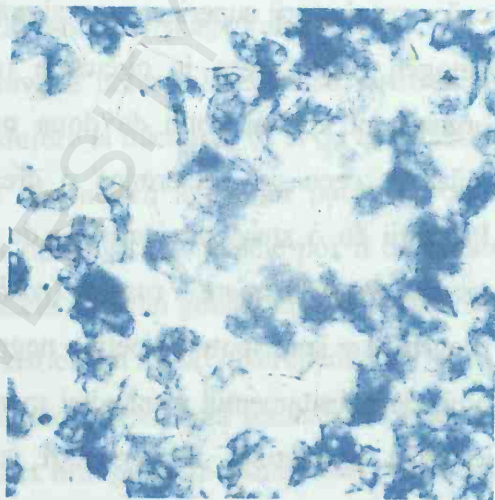


Fig. 21. Imagini microscopice ale speciei *Nocardia asteroides* in produs patologic (sputa), la pacienti imunodeprimati (trebuie sa fie diferentiati de filamentele miceliene si streptococi; pe frotiuri efectuate din subculturi, celulele sunt mai scurte);

a) frotiu colorat Gram – bacili Gram pozitivi, ramificati ;

b) frotiu colorat Ziehl-Nielsen (dupa o decolorare blanda)- bacili AAR (marire: x 1000).

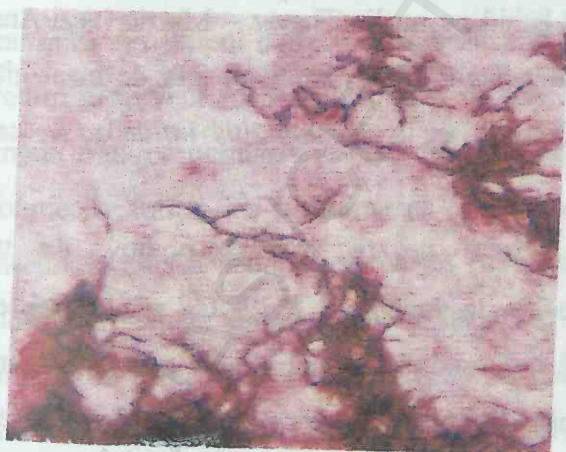


Fig. 22. Imagine microscopica pe preparat colorat Gram a unor bacterii din genul *Actinomyces* sp., ramificate (~ ramuri de copac), scurte (marire: x 1000).

Fig. 23. *Actinomyces israelii* – colonii in forma de dinte molar.

COCI GRAM NEGATIVI

G. Neisseria sp.

N. meningitidis – diplococ Gram negativ, oxidazo-pozitiv, incapsulat, numit in mod curent meningococ, care determina meningita. Se cunosc grupele serologice de meningococi A,B, C, Y si W-135. Meningococii patrund in organismul gazdei pe cale aerogena, prin picaturile Pflugge, eliminate de o persoana bolnava (rezervorul de infectie) prin tuse sau stranut, fiind germeni cu o slaba rezistenta in mediul extern, ceea ce explica aparitia cazurilor de meningita in colectivitati (scoli, cazarmi). In majoritatea cazurilor boala consta intr-o infectie a cailor respiratorii superioare, cu simptome asemanatoare gripei (*influenza-like*). Uneori, agentul patogen poate trece in circulatie (meningococemie), unde toxinele bacteriene pot invinge organismul in mai putin de doua ore, cauzând moartea. La supravietuitori, meningele este inflammat, ceea ce determina o crestere a presiunii asupra encefalului si maduvei spinarii. Pacientii au o stare caracteristica de rigiditate a corpului (intepeneala), gât arcuit si o cefalee intensa. Pe piele apare o roseata (*rash*), la inceput sub forma unor pete de un rosu deschis, care progreseaza spre spoturi vinetii – negre. Jumatate din cazurile netratate pot fi fatale. Diagnosticul precoce si tratamentul meningitei meningococice pot preveni leziuni ireversibile ale nervilor sau moartea pacientului. Tratamentul cu rifampicina, penicilina sau sulfamide este eficient in general. Un vaccin multivalent, continând polizaharide capsulare de la câteva serogrupe este produs din anul 1985, dar acesta este utilizat doar in circumstante speciale.

Diagnostic de laborator. Metoda principala de diagnostic este observarea microscopica a diplococilor Gram negativi in probele de lichid cefalorahidian, recoltate prin punctie spinala. *N. meningitidis* poate fi izolata si cultivata din acest lichid pe mediu Thayer – Martin (vezi Anexa IX). Este util si sistemul API NH. Este important diagnosticul diferential fata de meningitele determinate de alti agenti infectiosi (alte bacterii, cum ar fi *Haemophilus influenza b*, ca si microfungi, paraziti, virusuri).

Neisseria gonorrhoeae - diplococ Gram negativ, oxidazo-pozitiv, de mici dimensiuni, numit dupa Albert Neisser, cel care l-a descoperit in 1879. Ca si alte neisserii, gonococul are forma unor perechi de celule reniforme, imobile. Numit si gonococ, este agentul patogen al gonoreei, foarte sensibil in afara organismului gazda, ceea ce face ca foarte rar sa se produca infectarea de pe o suprafata uscata (de ex., de pe scaunul toaletei). Astfel ca in marea majoritate a cazurilor de gonoree, agentul cauzal se transmite de la persoana la persoana, prin contact sexual. Perioada de incubare variaza intre 2 si 6 zile. La femei, gonococii invadeaza suprafata epiteliala a cervixului si uretrei. Cervixul poate fi inflammat si o scurgere poate aparea

daca se exercita o presiune in regiunea pubiana. Pacientele reclama adesea durere abdominala si o senzatie de arsura la mictiune, iar ciclul menstrual normal poate fi intrerupt. Uneori, gonococii pot disemina spre trompele Fallope, care se intind de la uter la ovare. Cum aceste cai inguste sunt modificate in cursul infectiei, prezentând pliuri si bacterii aderate, trecerea ovulelor devine dificila. Se poate ajunge la blocarea completa sau salpingita; inflamarea tuturor organelor pelvice este cunoscuta sub numele de boala inflamatorie pelvica. Sterilitatea poate fi o consecinta a tesutului cicatriceal care ramâne dupa tratarea bolii sau femeia poate avea mai târziu experienta unei sarcini ectopice. Este important de semnalat faptul ca la femei aprox. 50 % din cazurile de infectii gonococice sunt asimptomatice, ceea ce favorizeaza transmiterea agentului patogen.

La barbati, gonoreea se manifesta mai întâi la nivelul uretrei. Infectia se insoteste de senzatia de furnicatura in penis, urmata in câteva zile de durere la mictiune, ca si de aparitia unei secretii la inceput apoase, apoi albicioase. Pe masura diseminarii agentului patogen, creste frecventa mictiunilor. Ganglionii limfatici inghinali se pot tumefia si testiculele pot fi dureroase. Infectia epididimului poate conduce la sterilitate. Simptomele infectiei gonococice la barbati tind sa fie mai acute decât la femei, astfel ca barbatii sunt diagnosticati si tratati mai repede.

Gonoreea nu apare numai la nivelul organelor genitale. Astfel, sunt semnalate cazuri de : faringita gonococica (agentul patogen transmis prin contact oral-genital) manifestata prin durere in gât si dificultati la inghitire; proctita gonococica, infectie a rectului (mai ales la homosexuali); conjunctivita sau keratita, infectii ale conjunctivei (transmitere prin atingerea conjunctivei cu mâna sau servetele contaminate).

Gonoreea este periculoasa mai ales la copii nascuti de catre mame infectate. Gonococii transmisi in timpul nasterii infecteaza ochiul nou-nascutului si genereaza oftalmia gonococica. Pentru a preveni aceasta infectie si orbirea consecutiva, in majoritatea statelor exista legi care impun tratarea ochilor nou-nascutilor cu câteva picături de solutie de nitrat de argint 1% sau solutie de antibiotice (eritromicina sau tetraciclina). Profilaxia acestei infectii se face doar prin masuri de igiena, deoarece nu exista vaccinuri disponibile. Producerea de vaccinuri anti- adezine, care utilizeaza ca antigene fimbrii purificate si care ar putea determina sinteza de anticorpi anti-fimbrii, cu efect de evitare a aderentei agentului patogen la suprafata celulelor sensibile, se afla in stadiu experimental si întâmpina dificultati datorita fenomenului de variatie antigenica.

Acest fenomen al variatiei antigenice reprezinta un mecanism prin care anumite specii de bacterii patogene sintetizeaza succesiv un numar mare de variante diferite ale moleculelor sau structurilor de suprafata, pentru a scapa de apararea imunitara a organismului gazda. Variatia

antigenica produsa *in vivo* ar fi determinata deci de presiunea imuna, care ar putea accelera evolutia sau selectia unor noi variante antigenice. Exemplul tipic de variatie antigenica la bacterii il constituie *Neisseria gonorrhoeae* – gonococul, comparat datorita acestei particularitati, de catre B. Brett Finlay si S. Falkow, cu un “cameleon iscusit” (mecanismul genetic de variatie antigenica a fimbriilor a fost prezentat in Cap. Factori de virulenta. Capacitatea de aderenta). Fenomenul explica incercarile nereusite de a obtine un vaccin anti-adezine pentru profilaxia infectiilor gonoreice, chiar si in cazul utilizarii unui vaccin polivalent.

Diagnostic de laborator.

Metoda « de aur » in diagnosticul gonoreei se bazeaza pe examinarea microscopica a frotiurilor efectuate din secretia tractului urogenital, colorate prin metoda Gram, ca si din culturi obtinute prin insamantarea produsului patologic pe mediu Thayer – Martin, pe culturi facându-se testul oxidazei. In identificare sunt utile si testele biochimice de fermentare a zaharurilor, sistemul API NH, metoda imunofluorescentei. Exista si teste rapide de diagnostic, bazate pe teste de aglutinare si pe metoda imunoenzimatica, care permit evidentierea indirecta a gonococilor in câteva ore si instituirea unui tratament in timpul cel mai scurt. Anticorpii anti-fimbrii isi gasesc aplicabilitate si in teste de diagnostic al infectiilor prin reactii imunoenzimatic, tip ELISA.

Diagnosticul se poate realiza si prin metode moleculare, de ex. prin teste de hibridizare a acizilor nucleici. Testul de diagnostic al infectiilor cu *Neisseria gonorrhoeae* prin metode moleculare (LCx *Neisseria gonorrhoeae* assay) se bazeaza pe reactia de amplificare LCR (*Ligase Chain Reaction*) pentru detectarea si cuantificarea moleculelor de ADN bacterian, direct in probele patologice reprezentate de probe de secretie endocervicala (de la femeie) sau uretrala (de la barbat), recoltate cu tamponul sau in probele de urina de la indivizi cu infectii simptomatice sau asimptomatice. Probele sunt tratate pentru ruperea peretilor celulari ai bacteriilor si separarea catenelor de ADN, prin incalzirea probelor in tamponul de transport al acestora.

Principiul metodei de amplificare LCR. Testul utilizeaza metoda LCR de amplificare a acizilor nucleici pentru a detecta prezenta gonococului direct in probele clinice. Testul utilizeaza 4 probe de oligonucleotide, complementare secventei tinta de pe gena *Opa* din genomul bacteriei *Neisseria gonorrhoeae*, pe care o recunosc si hibridizeaza cu aceasta, astfel ca secventele oligonucleotidice vor fi adiacente, moment in care pot fi legate (reunite) enzimatic, rezultând un produs de amplificare. Acesta, serveste ca tinta secundara pentru runde ulterioare de amplificare, produsul acesteia fiind detectat cu ajutorul unui analizor *Abbot LCx*.

BACILI GRAM NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI DREPTI

Fam. *Enterobacteriaceae*

Acest grup cuprinde bacili Gram negativi si constituie cele mai frecvente bacterii izolate din probele clinice. Sunt larg raspândite in natura, fiind prezente in sol si in ape, pe plante si, asa cum indica si numele familiei, in tractul intestinal al omului si animalelor; pot fi contaminanti ai alimentelor, atât de origine vegetala, cât si animala.

Bacteriile acestui grup au fost intens studiate datorita implicarii lor in patologia umana, largii raspândiri in natura, dar si datorita faptului ca au oferit un model ideal de studiu, prin cerintele lor nutritive reduse, ceea ce faciliteaza cultivarea si manipularea lor. Astfel:

- 1913 – Tworth – a descoperit liza fagica pe bacteria *E. coli*;
- 1918 – Bordet si Ciuca au descoperit fenomenul de lizogenie la bacterii tot pe *E. coli*; relatia virus-celula gazda a fost studiata pe modelul *E. coli* – bacteriofagul T4, rezultatele fiind extrapolate, cu prudenta, si la relatia celula animala – virusuri animale;
- 1925 – Gratia descopera bacteriocinele la *E. coli*, ceea ce explica denumirea initiala de colicine si de plasmide *col*;
- 1952 – Watanabe descrie la *Shigella sp.* fenomenul de rezistenta multipla la antibiotice;
- cercetarile de genetica bacteriana au avut ca modele de studiu tot enterobacterii: conjugarea bacteriana a fost studiata la *E. coli*, primele experimente de inginerie genetica s-au facut pe *E. coli K12*; in 1965 s-a acordat premiul Nobel pentru medicina geneticienilor Fr. Jacob si J. Monod pentru conceptul de operon si pentru modelul reglajului genetic pentru operonul *lac* ;
- studiul enterobacteriilor a permis si conturarea cadrului ecologiei intestinale, ca si a conceptului de «ecosistem intestinal» si descrierea relatiilor de simbioza, comensalism si competitie in cadrul acestuia si a modificarilor genetice produse *in vivo* – conjugarea, transformarea si dobândirea rezistentei multiple, demonstrându-se un potential foarte inalt de modificare a caracterelor biologice al bacteriilor intestinale; densitatea lor mare $-10^9/\text{g}$ materii fecale si durata de generatie mica faciliteaza studiul acestor modificari; aceste particularitati biologice si genetice explica unele aspecte epidemiologice, tipizarea infraspecifica fagica fiind foarte necesara la enterobacterii.

Înainte de utilizarea antibioticelor, substantelor chemoterapeutice și imunosupresoare, infecțiile determinate de enterobacterii erau relativ bine definite. Sindroamele diareice și dizenterice, însoțite de febră și septicemie în cazurile clasice de febră tifoidă și dizenterie erau cunoscute a fi determinate de *Salmonella sp.* și *Shigella sp.* Cazurile clasice de pneumonie, caracterizate prin producerea unei spute de un roșu-caramiziu ("currant-jelly") sunt cunoscute a fi determinate de bacilul lui Friedlander (*Klebsiella pneumoniae*). *Escherichia coli*, specii de *Proteus* și diferiți membri ai grupului *Klebsiella – Enterobacter*, sunt în mod obișnuit izolate din plăgi traumatice contaminate cu sol sau materii vegetale sau din plăgi operatorii abdominale, în chirurgia gastrointestinală.

Astfel, membrii acestei familii pot fi incriminați virtual în orice tip de boală infecțioasă și întâlnită în orice tip de probă biologică analizată la laborator. Pacienții imunocompromisi sau debilitați sunt foarte sensibili la infecții dobândite în spital (infecții nosocomiale), fie după colonizarea cu tulpini din mediu, fie după proceduri invazive, cum ar fi cateterizarea, bronhoscopia, colposcopia, biopsii prelevate chirurgical, în care membranele mucoase sunt traumatizate sau sectionate.

Enterobacteriile formează un grup relativ omogen de bacili Gram negativi, unii mobili, alții imobili, care nu sporulează, care sunt aerobi, facultativ anaerobi, cu metabolism oxidativ sau fermentativ (transformând glucidele și alcoolii superiori în acizi), cu proprietatea de a produce catalază și de a reduce nitrații la nitriți; nu produc oxidază (spre deosebire de speciile aparținând genului *Vibrio* și *Pseudomonas*); conținutul de baze azotate guanina-citozina variază între 35 – 65 moli. Dimensiunile celulelor variază între 2 – 5 μm lungime și 0,2 – 0,4 μm grosime; majoritatea speciilor sunt mobile, fiind dotate cu flageli peritrichi, în timp ce puține specii sunt capsulate.

Taxonomie și nomenclatură. Familia *Enterobacteriaceae* include aproximativ 28 genuri (nu mai există o altă grupă atât de mare), grupate în triburi, numărul speciilor fiind imposibil de cunoscut. Cele mai reprezentative genuri sunt următoarele:

Genul *Escherichia* cu cele 4 specii (specia *E. coli* fiind cea mai cunoscută) formează grupul tip pentru definirea familiei.

Genul *Edwardsiella* – specia *E. tarda* – nu este semnalată decât în țările calde, ca fiind patogenă la reptile și pasări.

Genul *Salmonella* – pentru identificarea speciilor acestui gen, în 1934 Kauffmann a propus criteriul taxonomic, iar toate serotipurile determinate au primit nume de

specii, astfel ca acest gen include în prezent peste 2000 de specii, sau mai corect serotipuri, grupate în 3 grupe mari:

- *S. cholerae suis*, agentul patogen al holerei porcine, care poate fi transmis și omului determinând o boală septicemică;
- *S. typhi*, agentul febrei tifoide la om;
- *S. enteritidis* împreună cu alte serotipuri reprezintă agenți patogeni ai toxinfecțiilor alimentare.

Genul *Shigella* – *Sh. dysenteriae*

- *Sh. flexneri*

Genul *Citrobacter* – *C. freundii*

- *C. diversus* (în prezent *C. koseri*)

Genul *Klebsiella* – *K. pneumoniae*

- *K. oxytoca*

Genul *Enterobacter* – *E. cloacae*

- *E. aerogenes*

- *E. agglomerans* (în prezent *Pantoea agglomerans*)

Genul *Hafnia* – *H. alvei*

Genul *Serratia* – *S. marcescens*

- *S. liquefaciens*

Genul *Proteus* – *P. vulgaris*

- *P. mirabilis*

Genul *Morganella* – *M. morganii*

Genul *Providencia* – *P. stuartii*

- *P. alcalifaciens*

Genul *Yersinia* – *Y. enterocolitica*

- *Y. pestis*

- *Y. pseudotuberculosis*

Membrii acestei familii sunt implicați în etiologia unor procese infecțioase la om, animale și plante. După activitatea patogenă la om enterobacteriile se clasifică astfel:

1. Bacterii înalt patogene (pestilente sau catastrofice);

Yersinia pestis- specie considerată în prezent una dintre cele mai agresive bacterii, este agentul patogen zoonotic al ciumei, fiind transmis de rozatoarele sălbatice; zonă endemică - M-tii Stancosi – S.U.A.

Salmonella typhi –agentul patogen al febrei tifoide;

Shigella dysenteriae (tip 1) – agentul patogen al dizenteriei maligne (zona endemica – Asia de Sud-Est) ;

2. Bacterii patogene ;

G. Salmonella (peste 2000 de serotipuri)

G. Shigella

Yersinia enterocolitica

3. Bacterii conditionat-patogene;

G. Citrobacter

G. Enterobacter

G. Klebsiella

G. Edwardsiella

G. Serratia

G. Providencia

G. Hafnia

In aceasta clasificare, *Escherichia coli* ocupa o pozitie intermediara intre gupele 2 si 3. Anumite tulpini de *E. coli* sunt capabile sa produca infectii severe intestinale si extraintestinale. Tulpinile patogene de *E.coli* , care au dobândit seturi de gene de virulenta, sunt capabile sa produca diferiti factori de virulenta cum ar fi factori de aderenta (fimbrii, capsule), toxine, siderofori. In functie de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip si manifestari clinice, tulpinile de *E. coli* care determina boli diareice pot fi diferiteiate in sase categorii majore desemnate ca:

- **Enteropatogene – EPEC** (Enteropathogenic *E. coli*) - serogrupele O cele mai comune (serogrupele O26, O55 etc.) poseda o plasmida de ~ 60 MDa, numita plasmida *EAF* = *EPEC adherence factor*, care determina capacitatea acestor tulpini de a produce un tip (*pattern*) de aderenta localizata la celulele liniei HEp-2 (fig. 24). Tulpinile EPEC determina diareea infantila severa la copilul sub vârsta de un an. Pe celulele epiteliale infectate formeaza colonii mici, proces denumit *aderenta localizata*. Aderenta initiala este urmata de atasarea intima a bacteriilor la suprafata celulelor gazda, mediata de proteina membranei externe numita *intimina* (94 kDa), care este considerata factor de virulenta al tulpinilor EPEC, fiind un produs al genei *eaeA* (exprimarea acestei gene este influentata de plasmida pMAR2 de 60-MDa care codifica formarea unor prelungiri membranare care leaga bacteriile aderente, numite in literatura de specialitate *bundle-forming pilus*=*BFP*). Dupa aderenta la suprafata celulelor

epiteliale, celulele EPEC produc leziuni de tip *attaching / effacing* (atasare-distrugere) = *A/E* (fig. 25), traduse in degenerarea microvililor celulelor cu marginea « in perie » si in organizarea filamentelor citoscheletului celulei epiteliale sub situsul de aderenta, rezultând structuri in forma de cupa (*cup-like*) sau pedestal (*pedestal-like*), care se pot alungi, formând proiectii de forma pseudopodelor. S-a dovedit ca formarea acestora este independenta de concentratia intracelulara a ionilor de calciu. In opinia unor autori, un factor major de virulenta al tulpinilor EPEC si *Shiga toxin (STX)-producing E. coli* (STEC, care sunt tulpini lizogene) in patogenia infectiilor intestinale la om si animale, este capacitatea de a cauza leziuni de tip *A/E* asupra microvililor enterocitelor. Rearanjarile filamentelor de actina si miozina sunt implicate si in internalizarea unor celule bacteriene de catre celulele gazda.

- **Enterotoxigenice – ETEC** (Enterotoxigenic *E. coli*) - izolate frecvent de la copiii cu diaree, in tarile in curs de dezvoltare ; tulpinile ETEC sunt si agentii cauzali ai « diareei calatorilor ». Capacitatea de a adera si a coloniza epiteliul intestinal este asociata cu prezenta unor antigene fimbriale de suprafata numite factori de colonizare CFA I si II (*CFA = colonisation factor antigens*), prezente numai la tulpinile diareagenice. Dupa aderenta si colonizarea mucoasei intestinului subtire, tulpinile ETEC determina un sindrom diareic prin inhibarea resorbtiei Na^+ si a apei, datorita producerii si eliminarii unor exotoxine, cu tropism pentru celulele intestinale = enterotoxine : o toxina termostabila (ST) sau termolabila (LT), sau ambele tipuri, aceste toxine fiind asemanatoare cu cea a vibriunii holerice (bacterie Gram negativa care produce de asemenea o exotoxina).
- **Enteroinvazive – EIEC** (Enteroinvasive *E. coli*) - penetreaza si se multiplica in celulele epiteliale ale colonului, producând modificari ale mucoasei intestinale si simptome asemanatoare cu cele prezente in sigeloza, infectie intestinala determinata de specii de *Shigella* , altele decât *Sh. dysenteriae*. Invazia celulelor intestinale de catre enterobacteriile conditionat-patogene (inclusiv EPEC, EIEC, EHEC, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*) se face cu participarea microtubulilor, rezultati prin polimerizarea tubulinei si, in general, nu este urmata de multiplicarea bacteriilor in celula gazda, astfel ca invazia in acest caz este doar o modalitate de a persista in organismul gazda. Spre deosebire de acestea, enterobacteriile patogene adaptate la parazitismul intracelular (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*), la care invazia (mediata de proteine ale membranei externe numite *invazine*) constituie un mecanism principal de virulenta, se multiplica masiv intracelular si lizeaza celula-gazda.
- **Enterohemoragice – EHEC** (Enterohemorrhagic *E. coli*) - apartin serogrupului O157 : H7, produc toxina *Shiga-like (SLT)* sau *verotoxina- (VT)* si determina producerea diareei, colitei

hemoragice si sindromului uremic hemolitic. S-a demonstrat ca si tulpinile EHEC, ca si alte enterobacterii cum ar fi *Citrobacter freundii* biotipul 4280, *Hafnia alvei* si mai recent *Enterobacter cloacae* (Lazar si colab., 2000) pot induce leziuni specifice la nivelul enterocitelor, de tip A/E (fig. 26). Aceste leziuni sunt determinate de o clasa de proteine ale membranei externe cu masa moleculara ~100 kDa, dintre care, mai bine caracterizata este *intimina*, codificata de gene cromozomale *eaeA*. Prin experimente de hibridare, s-a demonstrat ca aceste gene prezinta un grad mare de omologie cu genele *inv*, care codifica proteinele numite *invazine*, prezente in membrana externa a unor enterobacterii patogene : *Yersinia pseudotuberculosis* si *Y. enterocolitica*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*

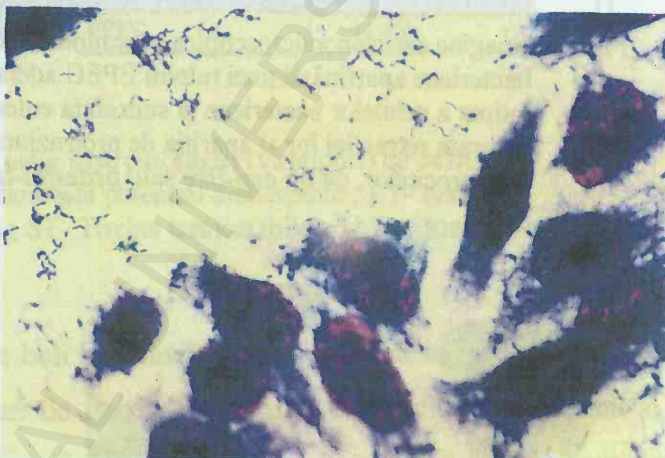
- **Enteroadherente sau enteroagregative – EAaggEC (enteroaggregative *E. coli*)** - mai recent descris, acest patotip este distinct de alte patotipuri de *E. coli*, prin proprietatea celulelor unor astfel de tulpini de a adera la culturile celulare in monostrat, având un fenotip agregativ (fig. 24), celulele bacteriene fiind suprapuse asemenea unor « caramizi ». Aceste tulpini produc diaree datorita unei toxine *ST-like* numita *EAST (enteroaggregative ST)* si o exotoxina de 120 kDa, similara cu hemolizina produsa de tulpinile uropatogene ;
- **Difuz aderente - DAEC (diffuse adherent *E. coli* - tulpini de *E. coli* care adera difuz la suprafata celulelor eucariote in cultura – fig. 24)**, care sunt de asemenea diareagenice la copilul mai mare de 18 luni.

Fiecare dintre aceste patotipuri afecteaza grupe diferite de populatie si au mecanisme diferite de patogenitate si virulenta. La om aceste grupe de tulpini de colibacili sunt asociate cu boala, incluzand diaree, boala dizenteriforma, colita hemoragica, sindromul uremic hemolitic, pneumonii, meningite si septicemii. Tulpinile patogene de *E.coli* poseda diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate si specificitate de receptor. Tipul 1 de fimbrii , capabile sa se ataseze la receptori care contin manoză (hemaglutinaea bacteriilor cu fimbrii manozo-sensibile este inhibata in prezenta D-manozei), determina aderenta celulelor de *E.coli* la mucus, la celulele tractului gastrointestinal, urinar, ale orofarinxului etc.), jucand un rol in colonizarea si diseminarea bacteriilor in corpul omului si animalelor. Mecanismele de patogenitate si virulenta ale acestor sase patotipuri ale tulpinilor diareagenice de *E. coli*, numite si *virotipuri* (termen derivat de la *virulenta*), sunt schematizate in fig. 27. Dintre numerosii agenti patogeni care provoaca infectii diareice (cauzele principale ale morbiditatii si mortalitatii in special in tarile subdezvoltate), reprezentantii familiei *Enterobacteriaceae* sunt predominanti, un loc aparte ocupându-l speciile conditionat-patogene,

Aderenta localizata



Aderenta agregativa



Aderenta difuza



Fig. 24. Tipuri (pattern-uri) de aderenta caracteristice tulpinilor de *E. coli* care adera la linia celulara HEP-2 (*Human Epithelioma*); imagini la microscopul optic (marire : x 2500).

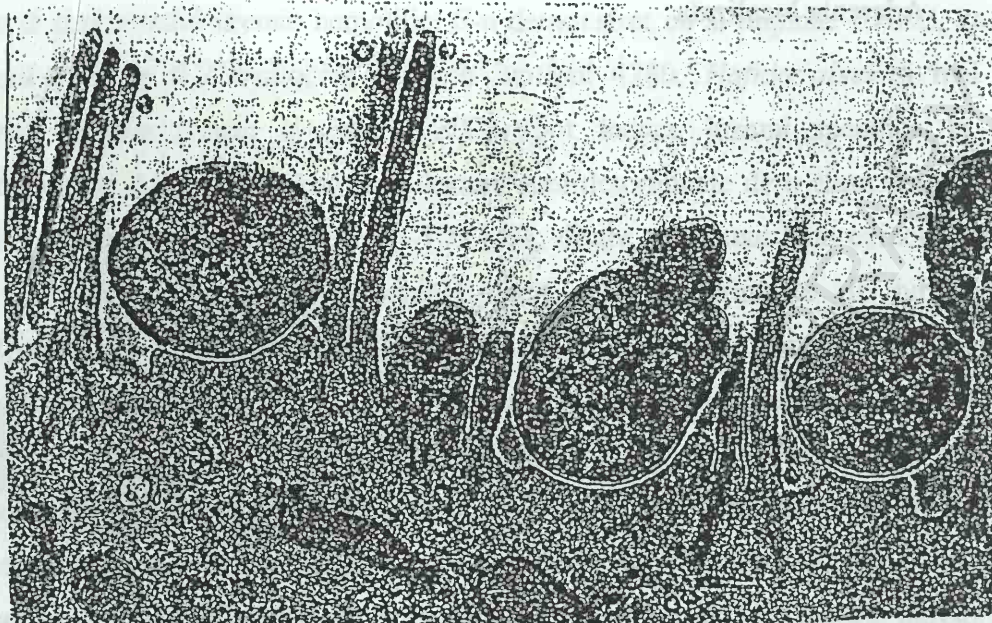
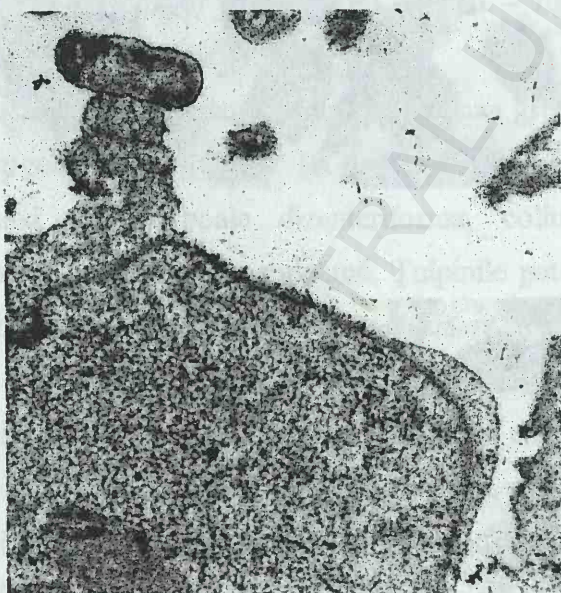
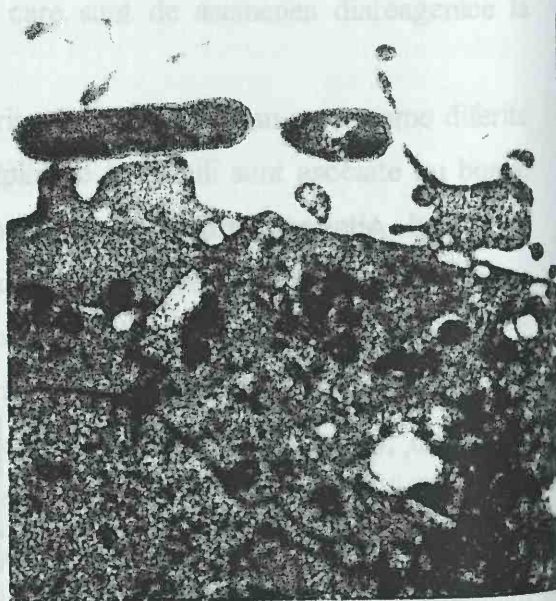


Fig. 25. Imagine electronmicroscopica a leziunilor caracteristice de tip A/E produse de celule bacteriene aparținând unei tulpini EPEC aderente la mucoasa intestinală; după atasarea intimă a celulelor bacteriene la suprafața enterocitelor, se remarcă dispariția microvililor, datorată reTRACTIEI lor și apariția de protruțiuni ale membranei plasmatică apicale a enterocitelor, de tip *cup-like* sau *pedestal-like* (Marire, x 45000).

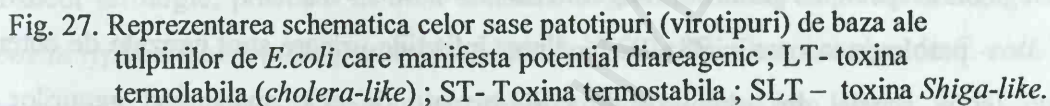


a)



b)

Fig. 26 a,b. Imagini ale unor secțiuni ultrafine examinate la microscopul electronic de transmisie, în care se observă celule bacteriene (*Enterobacter cloacae* 43) aderente la substratul celular (celule HEp-2 în cultură) și apariția de expansiuni ale membranei plasmatică, de tip *pedestal-like*, numite și leziuni de tip A/E (*attaching/effacing*) (Marire: a) – 10.230x ; b) – 9.150x).



Patogenii Gram negativi (majoritatea enterobacterii) sunt cauza a 69% din cazurile de boli bacteriene diareice cauzate de ingerarea de alimente contaminate, raportate in S.U.A. (Mendonca, 1994). Preocuparile in lume la acest moment sunt legate de reducerea contaminarii initiale prin masuri corespunzatoare, dar si pentru prevenirea formarii de biofilme bacteriene, deoarece s-a demonstrat ca principalii factori de virulenta ai tulpinilor patogene de enterobacterii conditionat-patogene, sunt factorii de aderenta si toxinele, dar si sinteza de capsule, siderofori s.a.. Boala diareica este o problema de mari proportii; se estimeaza ca in lume se produc 1 miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane de cazuri sunt fatale, ceea ce plaseaza bolile diareice pe locul doi in privinta cauzei mortalitatii prin boli infectioase. Cele mai multe cazuri mortale se inregistreaza la copilul mic si in tarile in curs de dezvoltare (raport O.M.S., citat de Janda si colab., 1998). In ciuda acestor cifre alarmante, agentii etiologici ai

gastroenteritelor infectioase rămân adesea nedetectati; investigații epidemiologice recente raportează o rată de detectare a bacteriilor enteropatogene în materiile fecale variind între 29,1% și 52,8 %. Printre agenții enteropatogeni descriși în ultimii ani figurează agenți “reputați”, cum ar fi de exemplu *E. coli* enteropatogenă, dar și unii mai noi: *E. coli* enteroadherenta, ca și unele bacterii considerate anterior ca simpli comensali ai tractului intestinal, printre care și o specie aparținând aceleiași grup al enterobacteriilor – *Providencia alcalifaciens*.

Tulpinile de enterobacterii lactozo-fermentative, aparținând unor specii care sunt membri ai microbiotei intestinale autohtone și deci nepatogene în mod normal, dobândind determinanți genetici care codifică factori de virulență, cum ar fi toxine, structuri de suprafață din categoria adezinelor, siderofori, își pot manifesta potențialul patogen generând infecții oportuniste.

Enterobacteriile reprezintă familia cea mai mare de bacterii implicate în patologia umană (urmate de anaerobi, streptococi, stafilococi), și anume în :

- I. – patologia enterala (digestivă) - aproximativ 1/3 dintre enterobacterii, în special *E. coli* și specii ale genurilor *Shigella*, *Salmonella* și *Yersinia*;
- II. – patologia urinară - 78 - 92 % dintre infecțiile urinare sunt cauzate de enterobacterii și în special de tulpini de *E. coli*, urmate de cele aparținând genurilor *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter* și *Serratia*.
- III. – patologia respiratorie, agenții cauzali aparținând genurilor *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter* și speciei *E. coli*.
- IV. – patologia generalizată (septicemică) – specia *E. coli* este frecvent implicată, dar și specii ale genurilor *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*.
- V. – patologia meningeală – se caracterizează prin forme severe de meningite, în special la copii la care bariera hematoencefalică este deficitară, cauzate de specii ale genului *Salmonella*, dar și *Serratia*, *Klebsiella*;
- VI. – patologia localizată a partilor moi, a mușchilor scheletici și a cavităților mari, în care sunt incriminate toate enterobacteriile, dar mai ales *E. coli*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter* care pot fi agenți de suprainfecție ai plagilor traumatice sau chirurgicale.

Din această enumerare rezultă că în afara de patologia intestinală care este dominată de specii de enterobacterii înalt patogene și patogene, enterobacteriile determină și infecții extraintestinale care sunt determinate de enterobacterii condiționat –patogene, care își manifestă potențialul patogen la gazde cu imunodeficit fiziologic (vârste extreme) sau patologic (de ex. la bolnavii canceroși). La aceste gazde cu mecanisme de apărare deficitare enterobacteriile pot trece mai ușor din intestin în circulație, dar se poate manifesta și o patologie de spital,

determinata de tulpini bacteriene selectate in mediul spitalicesc, plurirezistente la antibiotice, care cauzeaza infectii localizate (urinare, respiratorii), dar cu mare tendinta la diseminare. Enterobacteriile ocupa primul loc intre agentii cauzali ai infectiilor nosocomiale. Manevrele chirurgicale, endoscopice (invazive) pot antrena un numar imens de enterobacterii (care altfel nu pot depasi barierele naturale) dinafara sau din cavitati (infectii de origine endogena), in organism (inclusiv in cavitati indemne), fiind cauza unor infectii iatrogene. Numeroase sunt si infectiile asociate utilizarii dispozitivelor medicale protetice confectionate din biopolimeri, la care adera mai ales enterobacterii conditionat-patogene, aceste infectii fiind dificil de combatut datorita uneia din cele mai importante proprietati ale microorganismelor aderate - *rezistenta fenotipica* la substante antimicrobiene.

*

Diagnosticul de laborator al enterobacteriozelor urmeaza reguli prestabilite, in sensul ca pe langa diagnosticul bacteriologic care urmareste izolarea agentului infectios, este necesar si diagnosticul serologic, practicat in mod constant in febrele tifoide si paratifoide (agenti cauzali: *Salmonella typhi* si *Salmonella paratyphi*), dar si in cazul tulpinilor patogene de *E. coli*.

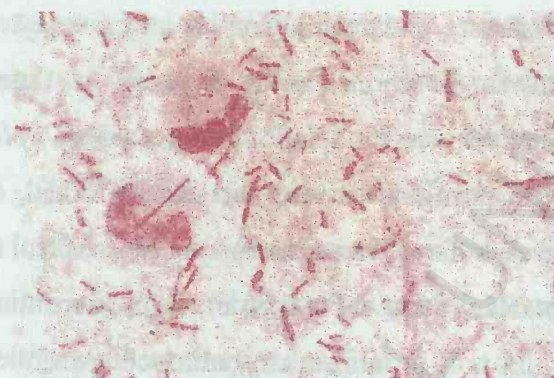
De exemplu, diagnosticul serologic al febrei tifoide se face prin reactia Widal, cu antigene somatice O si flagelare H. Reactia se pozitiveaza din a 2-a saptamana de boala, titrul anticorpilor fiind maxim in convalescenta (dupa 4-5 saptamani de la debutul bolii); titrul se mentine ridicat 5-6 luni, apoi scade, dar poate poate creste din nou in numeroase boli, inclusiv virale. O reactie pozitiva se repeta dupa minimum 7 zile si numai dublarea (cel putin) a titrului anticorpilor este considerata semnificativa, pe când o crestere moderata este nespecifica. Reactia serologica de evidentiare a antigenelor de invelis "Vi" este utila demonstrarii starii de purtator de salmonele in vezicula biliara.

In anumite cazuri, se practica si o reactie serologica de control, de confirmare a etiologiei infectiei, printr-o reactie de aglutinare in tub, intre celulele bacteriene apartinand tulpinii de *E. coli* sau *Proteus*, de ex. izolate dintr-o pielonefrita (infectie urinara inalta) si serul recoltat de la acelasi bolnav de la care s-a izolat tulpina bacteriana.

Diagnosticul bacteriologic urmeaza etapele clasice: izolarea in cultura pura si identificarea agentului patogen. Trebuie sa se ia in considerare doua aspecte : 1) implicarea foarte larga a enterobacteriilor in patologie, astfel ca pot fi prezente in numeroase produse patologice, cum ar fi materii fecale, urina, sânge, aspirat bronsic, lichid de ascita, colectii purulente, produse necrotice, ape, alimente etc. si 2) implicarea in patologie a speciilor conditionat-patogene, astfel ca in cazul acestor germeni, simpla lor evidentiare nu constituie o

Fig. 28. Identificarea prezumtivă a enterobacteriilor, pe baza caracterelor de cultura și morfologice:

- A- Imagine microscopică a unui frotiu efectuat din spută: bacili Gram negativi și leucocite PMNN;
 B- Colonii mari ale unor enterobacterii mobile și colonii punctiforme ale unor bacterii imobile, pe geloza sânge;
 C-Colonii mucoide pe mediu McConkey - *Klebsiella* sp.
 D- Creștere "în valuri" (invazie) pe geloza chocolate - *Proteus* sp.



A



B



C



D

dovada ca acestia reprezinta agentul cauzal al infectiei investigate, pentru aceasta fiind necesare dovezi suplimentare.

Produsele patologice si examenele de laborator prin care acestea sunt investigate au fost impartite in trei categorii:

- I. Prelevate fara microbiota asociata, recoltate din cavitati natural sterile: sânge, LCR, exudat pleural, peritoneal, toate colectiile nedeschise (articulare, abcese – se punctioneaza);
- II. Prelevate potential contaminate cu microflora de asociatie: bila, urina ;
- III. Prelevate natural contaminate: materii fecale, voma, resturi alimentare, probe necroptice, alimente, ape etc.

I. *Prelevate fara microbiota asociata, recoltate din cavitati natural sterile* : modul de prelucrare a acestor probe este relativ simplu, in sensul ca toate enterobacteriile cresc pe medii uzuale, cum ar fi geloza simpla, care permite izolarea enterobacteriilor, geloza-sânge (mai indicata in cazul asocierii cu coci Gram pozitivi si bacili Gram negativi mai pretentiosi, care nu cresc pe geloza) sau medii slab inhibitorii, cum ar fi geloza Mac Conkey sau geloza tip Levine (=EMB- *eozine, methylene blue* ; geloza, *eozina, albastru de metilen* = GEAM). De ex. speciile genului *Proteus* sunt foarte mobile si invadeaza placa, astfel ca nu se pot obtine colonii izolate; daca este prezent si un al doilea germen, acesta nu mai poate fi izolat. Mediile de imbogatire (lichide) sunt recomandate in cazul unor produse sarace in bacterii, ca urmare a inceperii unui tratament cu antibiotice. Se insamânteaza 1-2 ml de produs in bulion nutritiv, se incubeaza 24 h si din aceasta cultura se face insamântarea pe mediu solid pentru izolare.

Hemocultura se face respectând anumite reguli: recoltarea se face in maximum 24 h de la internarea pacientului, executându-se 3 punctii diferite, la intervale de 2 h de regula si minimum 30 min. Se recolteaza câte 10 ml de sânge, cu exceptia copilului de la care se recolteaza 2ml. Sângele se insamânteaza pe bulion simplu cu adaos de SPS (sodiu polyanethol sulfonat 0,025%), cu rol inhibitor al procesului de fagocitoza, ca si al antibioticelor aminoglicozidice (gentamicina, tobramicina); incubarea se face la 37°C, timp de 7 zile; dupa a 2-a zi de incubare se face obligatoriu examenul microscopic, chiar daca mediul este limpede, executând preparate dupa centrifugarea culturilor si care se coloreaza Gram. Se fac insamântari si pe geloza simpla, care se incubeaza aerob si anaerob.

- II. *Prelevate potential contaminate: urina, bila .*

Se practica *urocultura calitativa si cantitativa* (este unul din putinele cazuri de analize bacteriologice cantitative), scop in care se fac insamantari (din dilutii zecimale de proba, in striuri cu ansa calibrata sau cu pipeta si despersia inoculului) pe geloza simpla, geloza sânge si pe mediu selectiv Mac Conkey sau AABTL (agar albastru de brom timol lactoza). Urocultura este considerata semnificativa la densitati de peste 10^5 bacterii/ml urina. In cazul uroculturilor pozitive, se repica doua colonii dintre cele dominante, care se identifica biochimic.

III. *Prelevate natural contaminate* – dupa prelevare urmeaza o etapa de prelucrare, de aducere a acestuia in forma lichida sau semilichida, potrivita pentru inoculare. Materiile fecale, recoltate in coprorecoltoare se omogenizeaza in mediul de recoltare si transport (Cary-Blair sau Stuart) si apoi se fac insamantari cu scopul realizarii examenului microbiologic specific acestui produs biologic, numit *coprocultura*. Produsele solide sunt triturate in mojarie sterile, in proportie de 1/10 in apa fiziologica sterila. Din suspensia rezultata se fac insamantari. Pentru carne se admite folosirea unor mixere speciale, cu cupa si cutit detasabile, care se pot steriliza. Produsele semisolide (ou, creme) se emulsioneaza 1/10 in apa fiziologica sterila. Probele lichide, cum ar fi supuratiile plagilor deschise abcedate spontan, ale plagilor chirurgicale infectate, se insamanteaza ca atare.

Dintre bacteriile patogene, *Salmonella sp.* necesita folosirea unor medii de imbogatire, cum ar fi cel cu selenit acid de sodiu (10 ml + 7-10 picaturi de suspensie de materii fecale), mediu Muller-Kauffmann pentru *S. typhi*, bulion BGN (bulion pentru Gram negativi). Imbogatirea este necesara deoarece salmonelele provin in numar mare din alimente, se multiplica in partea anterioara a intestinului proximal si se elimina in numar mare, dar se dilueaza in scaunul diareic (2 - 3 l) din care se recolteaza o cantitate mica, astfel ca este necesara imbogatirea. Aceasta etapa intermediara nu este necesara pentru *Shigella* si *E. coli* care se dezvoltă in intestinul terminal, rectosigmoid si se elimina in numar mare in scaun.

Izolarea agentului patogen se face pe medii selective, solide, care contin inhibitori pentru alte grupe de bacterii decât cele de interes (mai ales pentru bacterii Gram pozitive si fungi). Exista trei grupe de medii selective: 1) slab selective, 2) moderat selective si 3) inalt selective.

1) – *medii slab selective* sunt medii cu putere inhibitorie slaba care permit dezvoltarea tuturor enterobacteriilor; inhiba *Proteus sp.*, *Alcaligenes sp.* (creste *Acinetobacter sp.*): mediul Mac Conkey, mediu tip Levine (incubare 24 h);

- pe mediul Mc Conkey se diferentiaza coloniile bacteriilor lactozo-fermentative care sunt rosii (si mediul in jurul lor devine rosu si opalescent), rotunde, bombate, umede, pe mediul slab roz. Coloniile bacteriilor lactozo-nefermentative sunt albicioase, mai putin intinse si nu modifica mediul (fig.29, A, B);
- pe mediul Levine (utilizat in special pentru analiza bacteriologica a apei) bacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii colorate in rosu inchis; *Klebsiella* formeaza colonii mai intinse si, ca si cele de *E. coli*, pot avea uneori luciu metalic (fig.29, C,D); coloniile lactozo-nefermentativilor sunt mai mici si nepigmentate.

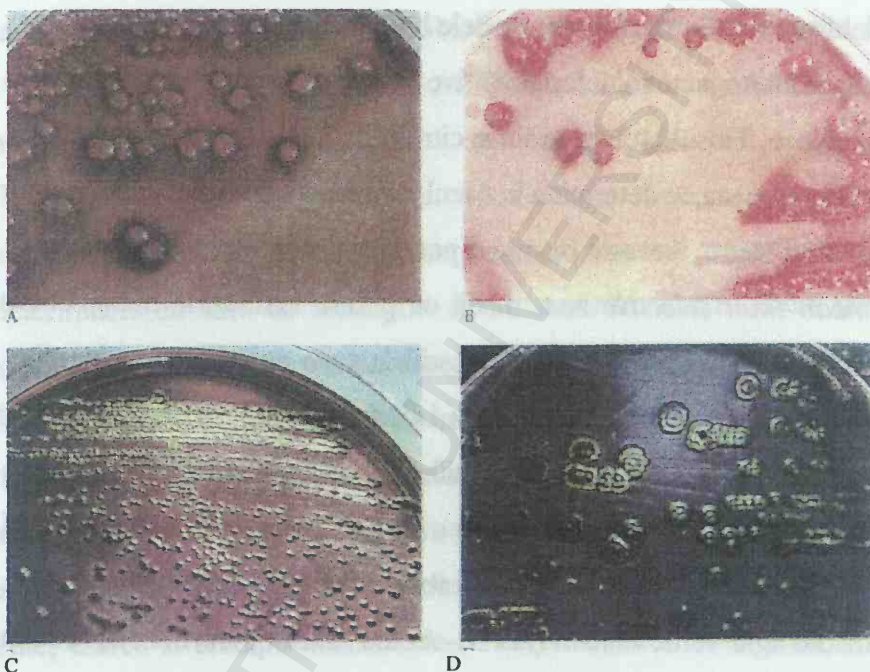


Fig. 29, A,B,C,D. Izolarea enterobacteriilor si diferentierea celor lactozo-fermentative pe medii slab selective: pe mediul Mc Conkie – A- enterobacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii rosii, care modifica mediul in jurul lor si B - enterobacteriile lactozo-nefermentative formeaza colonii nepigmentate, care nu modifica mediul; pe mediul Levine (EMB) – C – enterobacteriile lactozo-fermentative formeaza colonii colorate in rosu inchis si D - coloniile lactozo-nefermentativilor sunt mai mici si nepigmentate; *Klebsiella* formeaza colonii mai intinse (D) si, ca si cele de *E. coli* (C), pot avea uneori luciu metalic.

- 2) – *medii moderat selective* sunt medii cu putere inhibitorie medie, care permit dezvoltarea speciilor lactozo-nefermentative (*Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Yersinia sp.*, *Proteus sp.*) si inhiba partial enterobacteriile lactozo-fermentative si alti bacili Gram negativi: mediul A.D.C.L. (agar deoxicolat lactoza) si mediul S.S. (*Salmonella* - *Shigella*.) au compozitie asemanatoare si un timp de incubare de 24 - 48 h.

- mediul A.D.C.L. neinsamântat este roz, pe care lactozo-nefermentativii dezvoltă colonii semitransparente, rotunde, lucioase, care la 48 de ore devin negre în centru, evidențiind bacteriile producătoare de H_2S (*Salmonella sp.*, *Proteus sp.*); niciuna din speciile lactozo-fermentative nu produce centru negru. Aceste specii se dezvoltă sarac (mai ales *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*). *Serratia sp.* se dezvoltă și formează colonii roșii, bombate, dar nu se izolează niciodată din scaun (excepție - nou-născut).
- diferențierea genurilor pe mediul SS (*Salmonella* - *Shigella*.) se bazează pe fermentarea și absorbția consecutivă a indicatorului roșu neutru de către coloniile bacteriene. Bacteriile Gram pozitive și bacteriile coliforme sunt în mod obișnuit inhibate de sarurile biliare, verdele brilliant și citrați. *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* și alte bacterii lactozo nefermentative formează colonii translucide sau transparente, incolore. Tiosulfatul de sodiu și citratul feric, detectează producerea de hidrogen sulfurat, ceea ce determină în cazul unei reacții pozitive apariția unor colonii cu centrul negru. Această reacție o pot da și unele tulpini de *Proteus*.
- 3) *medii înalt selective* sunt medii cu putere inhibitorie mare, utilizate pentru izolarea salmonelelor (inhibă alte bacterii lactozo-negative - *Shigella*, *Yersinia*); mediu Wilson-Blair recomandat pentru izolarea speciei *S. typhi*; pe acest mediu cu aspect laptos (neinsamântat) - coloniile de *Salmonella* sunt negre, plate, rugoase și înconjurate de un halou negru, cu luciu metalic; alte enterobacterii, cum ar fi speciile genului *Proteus* dezvoltă colonii verzui-maronii, fără halou;
- mediu agar verde brillant (AVB)- mediu utilizat pentru izolarea salmonelelor din alimente și interzis în patologia umană pentru că inhibă *S. typhi*; pe acest mediu se dezvoltă colonii de un roșu-visiniu, pe fondul alb care virează în roșu-violet în jurul coloniilor. Se dezvoltă și piocianicul (*Pseudomonas aeruginosa*);
- mediul Istrati – Meitert (cu bilă bovină deshidratată);

Mediile înalt selective se examinează obligatoriu după 48 h de incubare.

Mediul Drigalski (AABTL) este un mediu diferențial folosit și în prezent pentru diferențierea speciilor lactozo-fermentative, de cele lactozo-nefermentative. Nu are inhibitori, nu este selectiv, permite creșterea și altor bacili Gram negativi, a cocilor și fungilor. Mediul neinsamântat este verde; coloniile speciilor lactozo-fermentative sunt galbene ca și mediul din jurul lor, iar cele ale speciilor lactozo-nefermentative nu virează sau virează la albastru intens.

La copil este obligatorie repicarea coloniilor lactozo-nefermentative. Regula generală: se repică cât mai multe colonii : 3-5 colonii, respectiv la adult și la copil (restricție economică).

Daca nu exista colonii lactozo-negative, in cazul in care proba analizata provine de la un copil se repica minimum 10 colonii lactozo-fermentative; explicatia consta in faptul ca in patologia copilului mic intervin adesea bacteriile conditionat-patogene, mai ales *E. coli*, care de regula este nepatogena si se repica 10 colonii pentru a creste sansa izolarii tulpinii patogene. La adult coloniile lactozo-pozitive se repica doar când exista tulburari de tranzit (mai ales la persoanele politratate cu antibiotice).

Microbiota lactozo-fermentativa depaseste 85-90% ; când exista o proportie mare de *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Hafnia*, aceasta poate indica o disbioza, mai ales la copiii polispitalizati. Scaderea numarului de *E.coli* sub 70% indica o disbacterioza, care nu se trateaza cu antibiotice, ci se recomanda administrarea de produse probiotice (de ex. preparate care contin tulpini selectate de *Lactobacillus sp.*) care printr-un fenomen de antagonism, inhiba bacteriile lactozo-fermentative din alte specii decât *E.coli*.

*

Salmonelozele. Se numara de obicei printre cele mai frecvent raportate boli transmise pe cale digestiva, determinate de sute de serotipuri de *Salmonella*. Pentru acest gen se foloseste notiunea de serotip, in locul celei de specie datorita unor relatii incerte existente intre aceste organisme. Totusi cele mai frecvente specii implicate in etiologia salmonelozelor sau ai **toxinfecțiilor alimentare (T.I.A.)** sunt: *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. enteritidis*, *S. newport*. Sunt bacili Gram negativi, cu flageli peritrihi, care patrund de obicei in intestinul uman odata cu alimentele. Dupa o perioada de incubare de 3 zile, individul infectat incepe sa manifeste febra, greata, vomismente, diaree si crampe abdominale. Ulceratiile intestinului sunt mai putin grave, comparativ cu cele din febra tifoida, iar patrunderea in circulatie este neobisnuita. Simptomele pot persista o saptamâna sau mai mult si in general aceasta boala este lasata sa evolueze fara administrare de antibiotice, care pot afecta tesuturile. Deshidratarea poate afecta anumiti pacienti si in aceste cazuri este importanta echilibrarea lor hidroelectrolitica.

Diagnosticul de laborator consta de obicei in izolarea tulpinii bacteriene din proba de scaun sau din proba recoltata cu tampon rectal, pe medii selective. Adesea infectia este numita gastroenterita sau simplu enterita.

Prin mijloacele moderne de detectie, agentii patogeni ai salmonelozelor au fost evidentiati si intr-o mare varietate de alimente: lapte pasteurizat, paste fainoase congelate, dar mai ales in carnea si produsele de carne de pasare, pentru ca diferitele serotipuri de *Salmonella* infecteaza in special gainile si curcanii. O alta cauza frecventa a salmonelozelor o reprezinta ouale contaminate, care intra in compozitia cremelor, placintelor, inghetatelor, maionezei. Inainte se

considera ca salmoneloza se datoreaza contaminarii cojii oualor si ulterior a continutului. Cercetatorii considera insa ca diferite serotipuri de *Salmonella* infecteaza ovarul gainii si trec in ou, inainte de formarea cojii. Daca este asa, inseamna ca pastrarea la frigider, decontaminarea cojii inainte de consum, sunt masuri inutile in prevenirea salmonelozelor.

Shigeloza. Membrii genului *Shigella* au fost pentru prima data descrisi de cercetatorul japonez K. Shiga in 1898 si 2 ani mai târziu, de microbiologul european Simon Flexner. Bacilii incadrati in acest gen infecteaza omul si primatele. Sunt agentii cauzali ai unor tulburari digestive, de la o diaree moderata, pâna la o dizenterie ce poate fi fatala. Dizenteria este un sindrom manifestat prin crampe abdominale puternice si scaune frecvente, de volum mic, mucoide si sanguinolente. Totusi, diareea neinsotita de eliminare de mucus si sânge, este un simptom mai frecvent decât dizenteria si in acest caz termenul de sigeloza este preferat. Sigeloza este determinata de unul din urmatoarele patru serotipuri de *Shigella* – *Sh. sonnei*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, dintre care *Sh. sonnei* este serotipul cel mai frecvent. Omul poate ingera acesti germeni odata cu apa si alimentele contaminate (oua, vegetale, crustacee, produse lactate). Odata patrunti in intestin, invadeaza celulele epiteliale intestinale si dupa 2 - 3 zile enterotoxinele produse determina un efect de eliminare a apei din celule. Infectia intestinului subtire se caracterizeaza printr-o diaree apoasa, in timp ce infectia intestinului gros determina eliminarea de scaune mucoide si sanguinolente, caracteristice dizenteriei. Majoritatea cazurilor de sigeloza evolueaza aproximativ o saptamâna, fara complicatii. Totusi, pacientii care pierd o mare cantitate de lichid, trebuie rehidratati, existând riscul unui colaps circulator, mai ales la copii si adulti debilitati. Antibioticele sunt uneori eficiente, dar alteori infectiile cauzate de tulpini de *Shigella sp.* purtatoare de plasmide R care le confera adesea multirezistenta la antibiotice, pot fi fatale. Cei care supravietuiesc, ramân purtatori pentru o luna sau mai mult, continuând sa elimine germeni prin materiile fecale. Nu exista un vaccin protector.

Diagnosticul clinic este confirmat de diagnosticul bacteriologic, realizat prin izolarea si identificarea agentului patogen, din scaunul pacientului, pe mediu selectiv *Salmonella – Shigella*.

Aeasta bacterie fost una dintre primele bacterii patogene pentru care s-a demonstrat un efect de inducere a apoptozei macrofagelor, proprietate asociata de obicei cu capacitatea bacteriilor patogene de depresie a raspunsului inflamator al gazdei pe care o invadeaza.

Identificarea agentului patogen urmeaza etapele obisnuite :

1. Examenul microscopic al culturilor in mediu lichid pe preparate proaspete L/L, pentru evidentierea mobilitatii;
2. Examenul caracterelor de cultura pe medii selective (solide) ;

3. Examenul microscopic pentru evidentierea proprietatilor morfo-tinctoriale, dupa efectuarea de frotiuri colorate prin metoda Gram si prin metode selective pentru evidentierea tulpinilor capsulate;

4. Testarea proprietatilor biochimice in scopul identificarii agentilor patogeni, numita si *biotipizare*. Dintre toate posibilitatile de tipizare si identificare taxonomica, biotipizarea este accesibila majoritatii laboratoarelor si in acelasi timp mult utilizata deoarece proprietatile biochimice ale bacteriilor sunt determinate de determinanti genetici cromozomali, astfel ca sunt mai stabile decât alte caractere determinate de existenta plasmidelor. Biotipizarea poate fi realizata in practica laboratorului clinic cu ajutorul sistemelor biochimice de identificare care au inregistrat o evolutie in timp de la aparitia lor si pâna in prezent, alegerea sistemului fiind in functie de posibilitatile laboratorului considerat:

a) **Sisteme conventionale sau de referinta**, efectuate individual: 1 test/ tub sau placa; in prezent sunt utilizate metode cromogene cum ar fi cea pentru testul oxidazei, care se efectueaza inaintea altor teste biochimice, toate enterobacteriile fiind oxidazo-negative (fig. 56 A); testele individuale se practica si ca teste suplimentare ale celorlalte sisteme, atunci când rezultatele acestora sunt neconcludente ;

b) **Sisteme de identificare biochimica multitest**, care utilizeaza medii speciale in volume mici (tuburi de hemoliza) si care permit efectuarea si interpretarea mai multor teste biochimice in acelasi tub. Mediile multitest utilizate pentru identificarea enterobacteriilor sunt: TSI si MILF. Mediul TSI (triple sugars iron) permite interpretarea a 4 teste biochimice: fermentarea glucozei +/- gaz; producerea de H_2S ; fermentarea lactozei si a zaharozei (vezi Cap. Diagnosticul microbiologic, fig. 56 C);

Mediul MILF (mobilitate; indol; lizin decarboxilaza; fenilalanina-dezaminaza).

Aceste doua tipuri de medii permit efectuarea a 8 teste biochimice (4 + 4); acestea se asociaza cu 2 teste individuale, respectiv cu testul ureazei (reactia Christensen) si testul utilizarii citratului ca unica sursa de C (reactia Simmons). Rezultatele acestor 10 teste biochimice (minimale) se interpreteaza cu ajutorul tabelelor de identificare (Anexa VII; tabel nr. 13) pentru enterobacterii si doar in situatia in care rezultatele anumitor teste sunt incerte se procedeaza la realizarea unor teste suplimentare (individuale), prin a caror asociere eficienta acestor sisteme poate fi crescuta.

c) **Sisteme microtest**, care se efectueaza in microvolume si asociaza un numar mare de

teste în aceeași placă/tub, fiind de regulă suficiente pentru a realiza o identificare precisă. Cele mai utilizate sisteme microtest pentru identificarea enterobacteriilor sunt *API 20E*, *Rapid ID 32 E*, *Enterotube II*, *Micro-ID*, *MicroScan*.

API 20E reprezintă un sistem de identificare performant care permite identificarea unui procentaj înalt de specii bacteriene în 18 – 24 ore, fără a necesita determinarea unor caracteristici fiziologice suplimentare. Sistemul reprezintă o versiune miniaturizată a procedurilor conventionale pentru identificarea enterobacteriilor și a altor bacterii Gram negative (etapele de lucru sunt schematizate în fig. 57).

Sistemul este însoțit de un catalog de identificare. Firma producătoare furnizează în prezent și un program computerizat de interpretare a rezultatelor și de identificare taxonomică a speciilor de enterobacterii, ca și a speciilor aparținând altor grupe de microorganisme de interes medical, gradul de corectitudine al identificării crescând foarte mult.

5) Testarea proprietăților serologice ale tulpinii bacteriene izolate; se fac teste calitative pe lama pentru antigenele O (fig. 60) și cantitative în tub pentru antigenele O și H, pentru evidențierea și titrarea antigenelor bacteriene cu scopul serotipizării tulpinilor izolate și realizării unor studii de epidemiologie. Identificarea biochimică a unor tulpini de *Salmonella*, *Shigella* și *E. coli* din gastroenterite, trebuie considerată o identificare prezumtivă și trebuie confirmată serologic.

6) Determinarea sensibilității la substanțe antibiotice (determinarea antibiotipului) prin metoda difuzimetrică, în varianta care utilizează discuri de antibiotice (metoda Kirby – Bauer, fig. 59).

7) Determinarea sensibilității la bacteriofagi (lizotipizare – fig. 61).

Microbiologii sunt în prezent alertați de emergența enterobacteriilor care prezintă rezistență multiplă la antibiotice. Unul din mecanismele prin care rezistența poate apărea la tulpini anterior sensibile, este transferul fără bariere de specie și gen al plasmidelor R, transfer ce se face cu multă ușurință în intestin unde densitatea populațională a enterobacteriilor este foarte mare, dar este demonstrat că se poate realiza și în mediul extern, de exemplu în sedimentele acvatice. Bacteriile Gram negative enterice posedă în mod obișnuit o singură plasmidă mare care codifică rezistența la câteva antibiotice. De exemplu, la *K. pneumoniae* gene care codifică sinteza β -lactamazei, gene care codifică factori de virulență pentru sideroforul aerobactina și operonul *cf29*, care codifică o adezină nefimbrială CF29K (implicată în fenotipul difuz de aderență), se găsesc pe o plasmidă conjugativă.

Tulpini ale genurilor *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella* si *Providencia*, adaugate la tulpinile de *Proteus* indol-pozitive si tulpinile de *E.coli* rezistente la cephalotin, poseda β -lactamaze inductibile care confera rezistenta la mai multe antibiotice β -lactamice. Enzimele inactivatoare sunt adesea determinate cromozomal si pot fi responsabile pentru marea rezistenta la pacientii care au fost tratati pentru septicemie.

Metoda discurilor pentru determinarea sensibilitatii poate sa nu detecteze intotdeauna tulpinile rezistente, mai ales c nd se testeaza cefalosporinele, astfel ca se recomanda utilizarea metodei dilutiilor si metoda E test (fig.46). Detectarea tulpinilor rezistente este importanta pentru pacient, dar si pentru monitorizarea infectiilor nosocomiale.

Diagnosticul socului endotoxic. Socul endotoxic este o manifestare potential letala a infectiilor cu bacterii Gram negative, inclusiv cu enterobacterii. Endotoxina este un complex farmacologic activ, reprezentat de lipopolizaharidele (LPS) continute in peretele celular al bacteriilor Gram negative. LPS sunt tristratificate, stratul extern fiind constituit din hidrati de carbon variabili ca structura, care determina specificitatea antigenica (Ag O), extrema in cazul genului *Salmonella* (peste 2000 serotipuri). Stratul median este un miez polizaharidic asemanator la diferite specii, iar stratul intern are o structura inalt conservata, fiind reprezentat de lipidul A. Efectele biologice la LPS au fost demonstrate experimental inject nt i.v. mici cantitati la animale, la care determina febra, leucopenie, hemoragii capilare, hipotensiune, colaps circulator, simptome care sunt in mare masura aceleasi cu cele observate la pacientii cu infectii septicemice cu bacterii Gram negative.

Testul cu lizat de limulus (care utilizeaza un reactiv preparat din amibocite ale crabului in forma de potcoava – *Limulus polyphemus*), a fost folosit cu rezultate variabile in diagnosticul socului endotoxic. Lizatul sufera un proces de gelificare cand vine in contact cu cantitati foarte mici, chiar urme de endotoxina.

Mai promitatoare in diagnosticul septic cu Gram negativi este utilizarea anticorpilor monoclonali, in tehnica ELISA sau alte tehnici, prin care se poate detecta lipidul A, pentru ca efectele farmacologice ale endotoxinei sunt atribuite in primul r nd lipidului A, care este puternic antigenic si are determinanti comuni tuturor tulpinilor de bacili Gram negativi. Astfel detectarea lipidului A circul nt la pacientii cu septicemie cu Gram negativi poate stabili diagnosticul si o terapie prezumtiva poate fi inceputa inainte ca organismul determinant al infectiei sa fie izolat si identificat.

Haemophilus sp.

În 1892, Richard Pfeiffer a izolat un bacil de dimensiuni mici, Gram negativ, capsulat, pe care l-a considerat agentul cauzal al gripei (*influenza*). Datorită acestei relații și preferinței pentru mediile cu adaos de sânge (*haemo-philus*) organismul a fost denumit *Haemophilus influenzae*. Totuși, în timpul mării epidemii de gripă din 1918 – 1919, bacilul lui Pfeiffer a fost considerat ca o cauză secundară a bolii, iar gripa propriu-zisă a fost considerată a fi determinată mai curând de un virus, decât de o bacterie.

În 1917, Davis a descris doi factori de creștere esențiali pentru bacteriile care determinau o boală influenza-like, unul derivat din hemoglobina și un altul derivat din relația de apropiere (satelită) cu *Staphylococcus aureus*. În 1921, Thjotta și Avery au desemnat factorul de creștere derivat din sânge ca *factor X*, iar pe celălalt ca *factor V*. Mai târziu, Lwoff a identificat factorul X ca fiind *hemina* și factorul V ca fiind *NAD* (nicotinamida dinucleotid). Factorul X din hemina a fost mai târziu identificat ca *protoporfirina* sau *protohem*. Nevoia de unul dintre acești factori sau de ambii, alături de reacțiile hemolitice pe mediu solid cu adaos de sânge de cal furnizează mijloace obiective de identificare a speciilor de *Haemophilus*. Metoda se bazează pe următorul principiu: mediul de cultură care conține infuzie de cord bovin suplimentat cu factori de creștere, se repartizează în plăci compartimentate în 4 sectoare sau cadrane; cadrantul I este suplimentat cu hemina (factor X), cadrantul II cu NAD (factor V), cadrantul III este suplimentat cu ambii factori, iar cadrantul IV este suplimentat cu NAD și conține de asemenea și sânge de cal, ca sursă de hemina și pentru demonstrarea proprietăților hemolitice ale speciilor de *Haemophilus*. Necesitățile pentru factori de creștere sunt demonstrate de creșterea sau absența creșterii în fiecare cadran.

Sunt bacterii cu caractere comune morfo-tinctoriale și biologice, care se diferențiază prin aceste exigente nutritive (pentru factorii de creștere X și V), ca și prin caractere de patogenitate, biochimice și structură antigenică.

Specii : de hemofili de la om care necesită ambii factori de creștere (X,V):

- *Haemophilus influenzae*;
- *H. haemolyticus*;
- *H. aegypticus* = *H. conjunctivalis* – specie izolată de Koch în 1883;

Specii dependente numai de factorul de creștere X:

- *H. aphrophilus*;
- *H. ducreyi*;
- *H. vaginalis* = *Gardnerella vaginalis*;

Specii dependente numai de factorul de creștere V:

- *H. parainfluenzae*;
- *H. parahaemolyticus*; + reacție de β -hemoliza ;

- *H. paraphrophilus*;
- *H. segnis*.

Acesti germeni fac parte din microbiota normala a orofaringelui , fiind omniprezenti in aceasta nisa ecologica a acestuia, reprezentând ~ 10% din microbiota totala a acestui habitat (din care 10% - *H. haemolyticus*, 90% - *H. parainfluenzae*); sunt prezenti si în placa dentara.

Patogenie. Colonizarea tractului respirator superior poate fi urmata in anumite conditii de diseminarea continua spre urechea medie, sinusuri, plamâni, facilitata de viroze respiratorii si exacerbata de boli alergice asociate. Ca si in cazul altor comensali, capacitatea de aderenta la epiteliul cailor respiratorii este o etapa fundamentala in procesul de colonizare si este mediat de structuri din categoria adezinelor.

Hemofilii sunt deci agenti conditionat patogeni care produc o gama larga de infectii , variate ca localizare, frecventa , gravitate. Cele mai frecvente infectii pot fi: epiglottita, pneumonia, celulita fetei, endocardita, pericardita, artrita, meningita, bacteriemii, septicemii; hemofilii pot ajunge si accidental in sânge, colon si apendice (de ex. *H. segnis* poate fi agentul cauzal al apendicitei).

Alte tipuri de infectii mai putin frecvente: abcese cerebrale, musculare, cutanate, osoase; mastoidite, otite, conjunctivite, sinuzite; infectii dentare si gingivale, faringiene; laringite, traheite, bronsite, abcese pulmonare, pleurezii; colici digestive, hepatite, apendicite, peritonite; cistite, uretrite; epididimite, vaginite, endometrite; infectii ale plagilor si grefelor.

Haemophilus influenzae este considerat in prezent ca o cauza relativ putin frecventa a infectiilor tractului respirator, acestea aparând in special ca o complicatie a unei boli anterioare. De asemenea, in ultimii ani *H. influenzae* tip *b* a atras atentia ca un important agent cauzal al meningitei la copii cu vârsta cuprinsa intre 6 luni si 2 ani. Agentul patogen poate trece din tractul respirator, in sânge si apoi spre meninge, determinând meningita cu *Haemophilus*. Simptomele bolii includ rigiditatea gâtului, durere de cap severa si alte simptome care dovedesc implicarea neurologica, cum ar fi: lipsa de atentie, toropeala si iritabilitate. Boala are o rata de mortalitate de 5 %. In tratament se utilizeaza combinatii de antibiotice care includ si rifampicina, deoarece marea majoritate a tulpinilor sunt rezistente si plurirezistente la antibiotice.

Specia *H. ducreyi* determina infectii cu transmitere sexuala si leziuni consecutive ale mucoasei genitale (sancru moale sau leziune sancroida). La inceputul infectiei apare o papula moale inconjurata de o zona ingusta de eritem, care evolueaza repede spre formare de puroi si apoi la leziune ulceranta superficiala, cu margini neregulate si moi (sancru moale), ceea ce permite diagnosticul clinic diferential fata de sancrul sifilitic; in plus, leziunea sângereaza usor si

este extrem de dureroasă, semne clinice care de asemenea diferențiază această leziune de sancrul sifilitic. Diagnosticul definitiv depinde însă de izolarea agentului patogen din leziune; la examinarea microscopică a unui frotiu executat din produsul patologic se poate evidenția uneori o grupare de bacili în «lant de bicicletă», caracteristică acestei specii. *H. ducreyi* este sensibil la tetraciclină, eritromicina, dar adesea boala se poate vindeca spontan.

Gardnerella vaginalis (specie anterior numită *Haemophilus vaginalis*) poate fi un comensal al vaginului (dar prezenta sa în populație este foarte inegală), care se poate comporta ca un patogen oportunist, generând infecții numite vaginite, și în astfel de cazuri patogenul se poate transmite și prin contact sexual. Cel mai pregnant simptom este un miros intens. Germenul este sensibil la tetraciclină.

Diagnosticul bacteriologic

1. Izolarea din produse biologice care sunt normal sterile: LCR, sânge, urină;
2. Izolarea din exudate formate în cursul proceselor infecțioase ale cavităților închise : spută, lichid pleural, lichid peritoneal;
3. Izolarea din secreții, colecții purulente formate în cursul unor procese infecțioase (otite, sinusale, conjunctivale, uretrale, genitale).

Interpretarea rezultatelor. Examenul este considerat pozitiv dacă se izolează din nisa ecologică respectivă un număr de peste 10 milioane germeni/ml, prezenți concomitent cu o manifestare clinică. Identificare biochimică – cu trusa *API NH* (2 ore de incubare). Examen serologic - semnificativă creșterea titrului Ac de 4x în 10-14 zile.

Gardnerella vaginalis – bacterie facultativ Gram variabilă, agent cauzal al vaginozei bacteriene. Determină un miros puternic al secreției vaginale și apariția unor celule “indicatoare” ale acestei infecții - celule epiteliale vaginale, înconjurate de bacterii. Testul “Whiff” – test al mirosului secreției vaginale tratate cu o soluție de KOH 10 %, care degajă un miros patruzător de pește. Totuși, acest test poate fi pozitiv și în trichomoniază (parazitoză).

***Bordetella* sp.**

Speciile acestui gen se prezintă sub forma unor cocobacili Gram negativi, cu lungimea de 0,2 – 0,5 μm , izolați sau formând lanțuri scurte (de 2 - 3 celule), izolați pentru prima dată de Jules Bordet și Octave Gengou în 1906, cunoscuți ca bacili Bordet – Gengou. Se numără printre agenții patogeni cel mai dificil de izolat și cultivat, fiind necesare tehnici speciale.

Specii mai frecvent izolate sunt: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*.

B. pertussis, specia reprezentativa a genului, este agentul etiologic al tusei convulsive.

Sunt bacterii strict aerobe, se dezvoltă la 35 – 37 °C, nu fermentează zaharurile, nu lichefiază gelatina, nu produc indol și H₂S.

Metode de cultivare și caractere de cultura. Tulpinile acestei specii sunt dificil de izolat și cultivat datorită exigentelor nutritive, necesitând medii nutritive bogate în aminoacizi, vitamine, ca și prezenta unor agenți reductori (fier feros, glutatión), săruri minerale (cloruri, fosfati), substanțe neutralizante ale inhibitorilor de creștere. *B. pertussis* este inhibat de o serie de constituenți comuni ai mediului, cum ar fi: acizi grași, ioni metalici, sulfuri și peroxizi. În mediul de izolare trebuie adăugate substanțe protectoare: amidon, carbune activ, albumina serică, sânge ș.a. Mediul de creștere de elecție este mediul Bordet – Gengou, care conține macerat de cartof glicerinat, gelozat, cu adaos de sânge. După însemănțarea pe acest mediu, după 2 – 5 zile de incubare la 37°C, *B. pertussis* formează colonii mici, convexe, ușor transparente, cu luciu metalic și înconjurate de o zonă de hemoliză difuză. Coloniile sunt foarte aderente la mediu. Această bacterie are o slabă rezistență în mediul extern (mai puțin de 2 h la temperatura camerei), astfel ca probele patologice suspecte necesită o prelucrare rapidă după prelevare. Tulpinile sunt sensibile la eritromicina, tetraciclină, cloramfenicol.

Factori de virulență: *hemaglutinina filamentoasă (PHA)* care aglutinează *in vitro* hematiile de om, soarece, iepure, gaină, iar *in vivo* acționează ca adezină, mediind aderența la epiteliul ciliat al căilor respiratorii; *pertactina* – o proteină de 69 kDa care mediază aderența la celulele de mamifer, *PT (pertussis toxin)* – o toxină termolabilă, care determină dermatonecroză la cobai și iepure. Această toxină poate inhiba anumite funcții fagocitare și poate contribui astfel la supraviețuirea intracelulară a bacteriilor. Explicarea simultană a factorilor de virulență produși de *B. pertussis* este controlată de locusul *bvg (vir)*. Fiind bacterii Gram negative sunt prezente și endotoxinele (LPS), cu efect pirogen.

Caractere antigenice. Toate tulpinile speciilor de *Bordetella* prezintă antigenul somatic “O” (LPS), termostabil, cu aceeași structură la toate speciile. Este prezent și un antigen de înveliș, tip “K”, termolabil, alcătuit din mai multe fracțiuni antigenice notate de la 1- 14. Toate speciile genului *Bordetella* au un antigen comun - antigenul K7, dar fiecare specie conține și câte un factor antigenic major, specie-specific. Pentru *B. pertussis* acesta este K1; *B. parapertussis* – K14; *B. bronchiseptica* – K12. Factorii antigenici comuni între specii explică reacțiile serologice încrucișate. Antigene flagelare “H” sunt prezente la specia mobilă *Bordetella bronchiseptica*.

Patogenitate. Sunt bacterii înalt patogene care se localizează și se multiplică la nivelul epiteliului ciliat din mucoasa traheo-bronsică, fără a invadea straturile de celule subiacente. Modificările patologice apar la distanță, datorită difuziei unor factori produși în cursul multiplicării. Speciile *B. pertussis* și *B. parapertussis* sunt patogene doar la om și determină boala numită tuse convulsivă, o boală infecto-contagioasă a copilăriei, a cărei incidență a scăzut mult datorită vaccinării în masă. Rar poate apărea și la adult. Agentul patogen se transmite pe cale aerogenă, prin picăturile Pflugge de la individul bolnav, aflat în stadiul cataral al bolii.

Sindromul clasic de tuse convulsivă începe după 7-10 zile de incubare, cu perioada prodromală, numită stadiu cataral, caracterizat prin simptome sistemice nespecifice și respiratorii. Tusea începe cu accese sporadice și progresează în 1-2 săptămâni la stadiul paroxistic, când accesele de tuse sunt frecvente și produc un sunet caracteristic, datorat unei inspirații forțate, glota fiind parțial închisă. În această perioadă apare limfocitoza.

Odată depășit stadiul paroxistic (după circa o săptămână), numărul germenilor eliminați scade. Concomitent scade și probabilitatea izolării agentului patogen din probele patologice analizate, deși tusea poate persista câteva săptămâni sau luni de zile. Specia *B. parapertussis* determină o formă de tuse convulsivă cu simptomatologie redusă, agentul patogen fiind rar izolat în laborator. Testarea serologică a populației arată ca aprox. 40% dintre indivizi au avut tuse convulsivă cu acest agent patogen. Infecția mixtă cu *B. pertussis* și *B. parapertussis* are ca efect intensificarea simptomului de tuse.

B. bronchiseptica este doar ocazional izolată de la omul cu infecții respiratorii sau ale plagilor (0,1 %) și mai frecvent de la animale: iepuri, cobai, maimute (rezervorul de infecție fiind sobolanii și pisicile). Este un bacil Gram negativ, tipic nefermentativ, obligat aerob și care produce alcalinizarea mediilor de cultură. Această specie a fost izolată și de la purtători. Au fost raportate cazuri simptomatice, cu manifestări medii de tuse (*pertussis-like*), la îngrijitorii de animale, dar și cazuri grave de bronhopneumonie și septicemie la alcoolicii malnutriți, de pneumonie la pacienții cu boala SIDA, de pneumonie și bacteriemie la cei care au suferit un transplant de măduvă osoasă, ceea ce evidențiază caracterul condiționat-patogen al acestei specii.

Sindromul de tuse convulsivă (= *sindrom pertussis*) nu se distinge din punct de vedere clinic de boala tipică, totuși examenul bacteriologic nu confirmă o infecție de etiologie bacteriană, acest sindrom fiind adesea determinat de adenovirusuri. În unele cazuri infecția este mixtă: bacteriană și virală. Numărul mare de infecții atipice impune cu necesitate stabilirea unui diagnostic diferențial prin metode specifice și nu prin teste nespecifice; de exemplu, hemoleucograma indică leucocitoză cu limfocitoză, ori limfocitoză la sugari este fiziologică.

Diagnosticul de laborator

- **bacteriologic** - urmareste izolarea si identificarea agentului patogen din secretia traheo-bronsica de la bolnavii suspecti clinic de tuse convulsiva. Rata de izolare a agentului patogen in prima saptamana de boala este de 90%, dar scade treptat, fiind mai redusa de 20% in a patra saptamana de la debutul bolii. Examenul fals negativ se poate datora si inceperii tratamentului cu antibiotice.

Prelevarea produsului patologic se poate face prin 2 metode: metoda placii tusite si metoda tamponului naso-faringian. Metoda placii tusite da rezultate bune in perioada catarala a bolii, când numarul germenilor eliminati odata cu picaturile de saliva in cursul unui acces de tuse este foarte mare. O placa Petri cu mediu Bordet-Gengou este expusa la 20 cm de gura bolnavului care tuseste. Recoltarea se face dimineata pe nemâncate. Metoda este avantajoasa deoarece mediul de cultivare este in acelasi timp si mediu de transport si conservare a viabilitatii bacteriilor. Cele trei specii pot fi diferiteiate net dupa caracterele fenotipice. *B. bronchiseptica* este mobila, datorita prezentei unor flageli peritrichi. *B. pertussis* si *B. parapertussis* sunt imobile. *B. pertussis* necesita medii speciale de crestere, in timp ce *B. parapertussis* creste pe medii uzuale.

Identificare biochimica – cu trusa API 20 NE (pentru bacili Gram negativi non-enterici).

Aceste trei specii nu pot fi diferiteiate genotipic prin teste de hibridizare, deoarece gradul de omologie interspecie a moleculelor de ADN este foarte mare.

- **serologic** - se face printr-o reactie de aglutinare in tuburi, pentru evidentierea in serul bolnavilor a anticorpilor aglutinanti anti-pertussis sau anti-parapertussis. Testul este util in conditiile in care izolarea germenilor se face mai dificil, dar are valoare retrospectiva, deoarece anticorpii aglutinanti sunt decelabili dupa 2 saptamani de la debutul bolii. Testul se executa atât cu antigen pertussis, cât si cu antigen parapertussis, lucrându-se in aceeași sedinta 2 seruri izolate de la același bolnav, recoltate la interval de 21 de zile, pentru a determina cresterea in dinamica a anticorpilor. Metoda este foarte sensibila si foarte specifica. Deoarece populatia infantila este imunizata prin vaccinare, diagnosticul serologic este considerat semnificativ, daca titrul anticorpilor anti-pertussis creste de cel puțin 4 ori, de la prima la a doua determinare.

La indivizii neimunizati si netratati cu antibiotice, infectia poate persista mult timp.

Legionella pneumophila

Acest agent patogen a fost descoperit in imprejurari dramatice : in iulie 1976, intr-un hotel din Philadelphia, 140 de participanti la Conventia Anuala a Legiunii Americane din Pennsylvania, ca si alte 72 de persoane din hotel sau din jurul hotelului, s-au imbolnavit,

prezentând simptome ca : febra, tuse, pneumonie. S-au înregistrat 34 de decese din cauza acestei boli și a complicațiilor sale. Prima ipoteză care încerca să explice etiologia acestor infecții, a fost cea referitoare la un val epidemic de gripă. De-abia în ianuarie 1977, cercetătorii au anunțat izolarea din țesutul pulmonar al unui pacient, a unei bacterii necunoscute anterior. S-a stabilit că această bacterie era responsabilă pentru « boala legionarilor » sau legioneloză, așa cum avea să fie denumită, ca și pentru un număr de boli pneumonia-like, nediagnosticate anterior și chiar epidemii nerezolvate.

Legionella pneumophila, agentul etiologic al legionelozei este o bacterie Gram negativă, bacilară, mobilă, de dimensiuni mici ($0,3 - 0,9 \mu\text{m}$ / $2 - 4 \mu\text{m}$), deși formele filamentoase pot atinge $20 - 40 \mu\text{m}$; este strict aerobă (creștere stimulată de prezența a 2,5% CO_2), nesporulată, necapsulată. Este prezentă în general acolo unde se colectează apă ; aparent este un patogen transmisibil pe cale aerogenă, dar de fapt se transmite prin picăturile mici de apă, din aerul brizei, de lângă torenți ; legionelele pot fi prezente și în instalațiile de aer condiționat și de apă caldă (se pot dezvolta la temperaturi de $35 - 45^\circ\text{C}$), ca și în apele stagnante (lacuri, băi).

Legionelele sunt dificil de cultivat în laborator, necesitând medii cu hemoglobină și aminoacizi. În mediul natural se pare că supraviețuiesc datorită unor factori de creștere produși și eliminați în mediul acvatic de către cianobacterii. S-a demonstrat că legionelele supraviețuiesc în ape și incluse în protozoare (amibe). Rezistă la temperaturi cuprinse între $0 - 56^\circ\text{C}$ și la pH acid. Sunt distruse prin expunere la 58°C , timp de 30 minute. Sunt sensibile la dezinfectanți care eliberează clor, astfel ca prin procedeul de clorinare a apei se evită răspândirea legionelilor. Sunt sensibile de asemenea, la fenol, formol, alcool de 70° și compusi cuaternari de amoniu.

Patogenie. Picăturile de apă contaminate patrund prin căile respiratorii umane ; perioada de incubare este de câteva zile ; simptomele legionelozelor : febra, tuse uscată eventual cu puțină spută, posibil diaree și vomă; legionelele sunt patogeni oportuniști. Legionelele sunt sensibile *in vitro* la numeroase antibiotice, dar nu se pot utiliza decât cele care patrund în macrofage, datorită multiplicării intracelulare a agentului patogen ; tratamentul i.v. cu eritromicina este eficient. Transmiterea de la persoană la persoană este neobișnuită. În afară de forma clasică, acută a legionelozelor, există și o formă benignă, numită « febra de Pontiac », caracterizată prin perioada de incubare scurtă (36 ore), absența atingerii pulmonare și vindecare spontană.

Caractere biochimice. Legionelele sunt catalază-pozitive, sunt proteolitice (hidrolizează gelatina). Nu metabolizează hidrații de carbon, nu reduc nitrații și nu hidrolizează ureea. O caracteristică a genului *Legionella* este prezența unui procent mare în structura peretelui celular a

acizilor grasi ramificati (90% din totalul acizilor grasi) cu 14 –17 atomi de carbon, cu profiluri caracteristice pentru diferitele specii.

Persistenta legionelelor in instalatiile de apa si aer conditionat, pe dispozitive medicale, se explica printr-o mare capacitate de aderenta la metale, care le stimuleaza si cresterea (fier, zinc, aluminiu). Apar probleme majore in contextul sanatatii publice, care privesc distributia apei potabile prin conducte pe care se formeaza biofilme bacteriene. In sistemele de distributie unde se formeaza aerosoli inhalabili (sisteme de aer conditionat, dusuri cu apa fierbinte- apa calda nefiind clorinata) pot fi prezente in biofilme si agentul patogen al “bolii legionarilor”, considerat factor de biohazard (*biohazard infections*).

Diagnosticul de laborator

Diagnostic bacteriologic

Se izoleaza pe mediul BCYE (*Buffer Charcoal Yeast Agar*), care contine carbune, extract de drojdii, L-cisteina, pirofosfat feric si agar. Perioada de incubare 3 – 7 zile. Coloniile sunt pigmentate in gri, lucioase, polimorfe, cu aspect caracteristic de geam crapat, la examinarea cu lupa. Se coloreaza in rosu prin metoda Gimenez si in albastru prin metoda Giemsa.

Studiul proprietatilor metabolice (testul catalazei, al hidrolizei gelatinei, ureei, al reducerii nitratilor, al fermentatii zaharurilor).

Diagnostic imunologic

In urina pot fi evidentiante antigene solubile specifice legionelelor, prin latex aglutinare, ELISA, RIA.

Legionelele se evidentiaza in produsele patologice (aspirat bronsic) si in culturi prin imunofluorescenta directa .

Metode moleculare: utilizarea de sonde nucleotidice si a metodelor de amplificare genica.

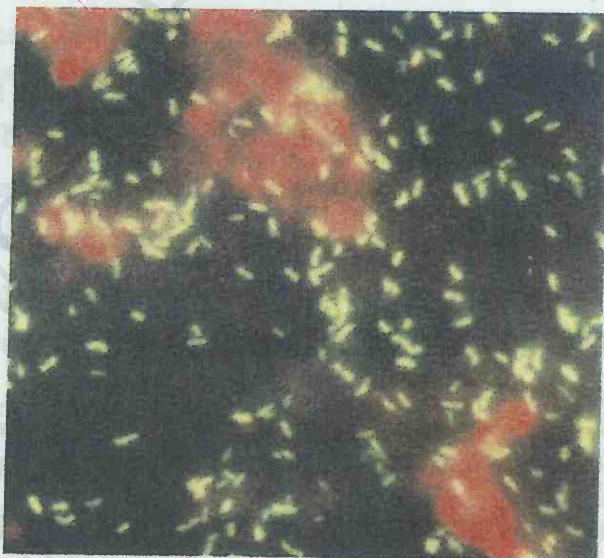


Fig. 30. *Legionella pneumophila*, evidentiata prin metoda imunofluorescentei in produs patologic (aspirat bronsic) (marire: 400x).

Brucella sp. Speciile genului *Brucella* includ bacterii Gram negative, în forma de cocobacili, paraziti facultativ intracelulari ai sistemului reticulo-endotelial la animale, de la care pot fi transmisi și omului.

Patogenie. Brucelele sunt agenții patogeni ai unei antropozoonoze, numita bruceloza. Specia reprezentativă a genului este *B. abortus*, parazita la bovine. Aceasta specie manifestă histotropism pentru organele genitale interne și are o afinitate deosebită pentru un component glucidic – *erythritol*, prezent în concentrație semnificativă în placenta bovină, nu și umană. Se poate localiza și în glandele mamare de la vacile infectate. *Brucella sp.* produce leucopenie marcată, prin efect direct asupra măduvei hematogene;

B. melitensis infectează caprele și determină boala cunoscută și sub numele de „febra de Malta” sau „febra mediteraneană”, răspândită în țările mediteraneene și în Orientul Mijlociu. Agentul patogen poate fi prezent și în brânza de capra. Infectează sistemul reticulo-endotelial, măduva osoasă, ficatul, splina și alte situsuri inaccesibile fagocitelor circulante, astfel ca infecțiile determinate de acest agent patogen se cronicizează. Alte specii: *B. canis*, *B. suis* ale caror gazde sunt câinele, respectiv porcul.

Rezervorul de infecție este reprezentat de mamiferele domestice, la care agentul patogen se transmite prin aerosoli sau contact cu secreții contaminate. Omul se poate infecta direct din rezervorul natural, pe cale cutanată (leziuni minime la nivelul pielii + contact cu țesuturi, sânge, urină, fetoși avortați, placentă, secreții vaginale infectate) și pe cale respiratorie (inhalație de aerosoli) sau indirect, pe cale digestivă prin consum de carne, lapte și produse derivate, netratate sau insuficient tratate termic.

Perioada de incubare variază între 5 - 21 zile, rar o perioadă mai lungă, de câteva luni. Sunt frecvente infecțiile usoare sau chiar inaparente. Infecțiile simptomatice (acute, subacute, cronice) se manifestă prin febră continuă sau intermitentă (ondulantă), de durată variabilă, cefalee, vomismente, transpirații, frisoane, artralgii și dureri generalizate. Datorită histotropismului agentului patogen pentru organele genitale, infecția poate determina avorturi spontane la om și animale. Boala poate dura câteva zile, mergând până la luni și ani de zile. Bolnavii sunt recuperabili în general, dar rămân cu o ușoară slăbiciune. Diagnosticul clinic este dificil, datorită absenței unor simptome patognomonice. Se țin cont de datele din anamneză, ca și în cazul diagnosticului de laborator, respectiv de riscul reprezentat de o meserie care presupune contactul cu animalele (ingrijitori de animale, veterinari) sau de consumul de alimente de origine animală dintr-o sursă necontrolată și neavizată din punct de vedere sanitar-antiepidemic. Uneori, prin expunere repetată, se poate produce sensibilizarea acestor persoane față de antigenele brucelice și reacții de hipersensibilitate la *Brucella* (reacții alergice cutanate).

Diagnosticul de laborator.

- **diagnostic bacteriologic** – se bazează pe izolarea agentului patogen din sânge, măduva oaselor și alte țesuturi sau din secrețiile pacientului, pe medii de cultură îmbogățite și care se incubază în prezența a 10% CO₂;
- **diagnostic imunologic** – reacții *in vitro*: reacția de aglutinare pe lama (reacția Huddleson) sau în tub efectuate cu antigen brucelic și ser de la pacientul suspectat de o bruceloza; testul cantitativ în tub, se efectuează cu seruri perechi, pentru a se observa creșterea în dinamică a titrului anticorpilor; un titru al anticorpilor de minimum 1/160 este semnificativ pentru diagnostic.

BACILI GRAM NEGATIVI FACULTATIV ANAEROBI INCURBATI

Vibro cholerae

Fam. *Vibrionaceae* – *G. Vibrio* – specia tip *V. cholerae* (agentul patogen al holerei)

- *G. Aeromonas*
- *G. Plesiomonas*
- *G. Photobacterium*
- *G. Lucibacterium*

Speciile incadrate in genul *Vibrio* constituie componente ale micropopulatiei acvatice, fiind mai ales germeni habituali ai mediului estuarin si marin. In functie de criteriul halotolerantei, speciile acestui gen se impart in doua categorii:

- 1) Categoria speciilor care cresc la concentratii de NaCl care variaza intre 0 – 3% si care grupeaza serogrupurile O1, biovar Clasic si biovar El Tor, ca si serogrupurile non-O1 (notate de la 1 la 139). In functie de patogenitate, tulpinile acestei specii se impart in doua grupe: holerigene (O1 si O139) si nonholerigene. Specia *V. mimicus* face trecerea intre vibriunii holerici si speciile halofile. *V. metschnikovii* este singura specie oxidazo-negativa.
- 2) Categoria speciilor care cresc la concentratii de NaCl care variaza intre 3 – 10%; in aceasta categorie sunt incluse 12 specii halofile, dintre care 9 sunt de interes medical, fiind patogene la om, mai frecvent intalnite fiind: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. costicola*.

Vibriionul holeric a fost izolat pentru prima data in 1883 de catre R. Koch in India, in Delta Gangelui. Pâna in prezent a generat 8 pandemii de holera, ultima in 1992, cu originea tot in India - Madras.

V. cholerae - bacili Gram negativi, drepti sau incurbati (forma de virgula o au doar când frotiul se executa de pe mucoasa intestinala), nesporulati, necapsulati (serogrupul O139 este capsulat), foarte mobili, cu flageli peritrichi sau monotrichi de tip polar in mediu lichid si laterali pe mediu solid. Sunt aerobi, facultativ anaerobi, cu metabolism oxidativ-fermentativ, oxidazo-pozitivi. Tulpinile care apartin biovarului clasic sunt nehemolitice si mai sensibile la clor (spre deosebire de biovarul *V. cholerae* O1 El Tor, care este hemolitic si mai rezistent la clor). Tulpinile acestei specii sunt prezente in mediul acvatic, frecvent asociate cu fito- si zooplanctonul. Sunt patogene pentru animalele acvatice, dar si pentru om, la care pot genera infecti intestinale, dar si extraintestinale, de acestea fiind responsabile serogrupurile non-O1, care pot determina infectii ale plagilor si septicemii.

Caractere de cultura. Cresc bine la pH alcalin (~9) in mediu aerob. In medii lichide formeaza un val la suprafata culturii, pe medii solide formeaza colonii mici, transparente

(“picături de roua”). Vibriionul holeric prezinta doua faze, una flagelata care formeaza colonii de tip “S” si o faza fimbriata care formeaza colonii de tip “R”.Sunt rezistenti la saruri biliare, de aceea mediile cu adaos de bila sunt folosite ca medii selective (de ex. mediul de izolare B.S.A.= *bile salts agar*, mediul T.C.B.S.= *tiosulphate citrate bile sucrose*).

Rezistenta. Serogrupul holerigen O1 grupeaza specii care au o slaba rezistenta in mediul extern, fiind sensibili mai ales la uscaciune, ceea ce explica transmiterea lor pe cale hidrica. Supravietuiesc in ape de izvor, râuri, ape de coasta, golf, mare. Rezista un timp limitat in organismul purtatorilor sanatosi; in materiile fecale, impreuna cu microbiota de asociatie pot trai câteva ore, in conditii de inghetare o luna, in alimente de la câteva ore la cateva zile (in lapte). Sunt extrem de sensibili la aciditatea gastrica, totusi daca doza infectanta este mare, ramâne un numar suficient de mare de vibrioni pentru a coloniza intestinul. Sunt distrusi prin expunere la 50°C timp de 60 min si instantaneu la 100°C. Sunt sensibili la radiatiile solare si UV, la substante antiseptice si dezinfectante (sunt distrusi in 5 min de contactul cu fenol, formol si instantaneu de solutia de sublimat 1‰), ca si la antibiotice de tipul streptomicinei, tetraciclinei, cloramfenicolului si sulfamidelor. Fenomenul de multirezistenta la antibiotice este mult mai putin frecvent, comparativ cu alte bacterii enterice, astfel ca tratamentul nu este precedat de antibiograma. Desi sunt sensibili la antibiotice, cheia tratamentului nu este antibioterapia, ci inlocuirea lichidelor pierdute si reechilibrarea hidroelectrolitica (pe cale parenterala si orala).

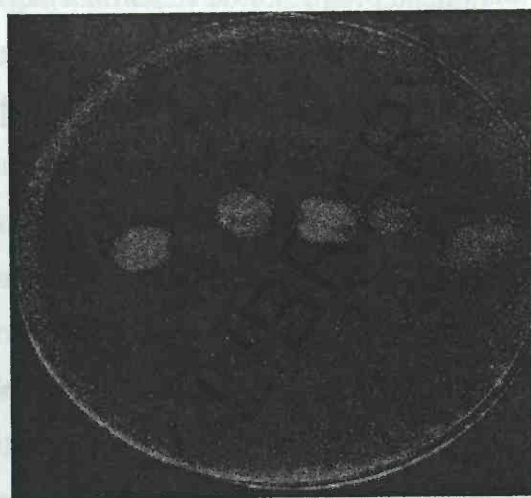
Caractere biochimice. Vibrionii sunt oxidazopozivi, fermenteaza glucoza fara producere de gaz. Tipul clasic fermenteaza manoză, zaharoza, arabinoza, in timp ce unele tulpini aparținând biovarului El Tor fermenteaza tardiv lactoza (72 ore) si nu fermenteaza arabinoza. Produc enzime cum ar fi cazeinaza, lipaza (fig. 31). Alte caractere care permit diferentierea tulpinilor serogrupului O1, biovar Clasi si El Tor, sunt prezentate in tabelul nr. 8 .

Tabel nr. 8. Caractere diferentiale ale tulpinilor serogrupului O1, biovar Clasic si El Tor.

Caractere \ Biovar	O1	El Tor
Reactia rosu metil	+	-
Reactia Voges Proskauer (VP)	-	+
Hemoliza	-	+
Sensibilitatea la fagul « IV »	+	-
Sensibilitatea la fagul « el 5 »	-	+



A.



B.

Fig. 31. Teste biochimice caracteristice speciei *Vibrio cholerae* :

- A. Testul de evidentiare a cazeinazei; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu cazeina solubila ; tulpina cazeinaza-pozitiva (al 3-lea spot) a hidrolizat cazeina solubila, rezultând cazeinat de calciu care precipita sub forma unui inel, in jurul zonei devenite clare datorita hidrolizei substratului.
- B. Testul de evidentiare a lipazei ; cele 5 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu adaos de TWEEN 80 ; primele 3 tulpini prezinta o reactie pozitiva, evidentiata prin aparitia unui halou clar in jurul coloniilor, iar ultimele doua tulpini sunt lipoza- negative.

Caractere antigenice. Prezinta antigene somatice O (A,B,C...M), pe baza carora s-au stabilit cele 139 grupuri serologice (serogrupul O1 este strict specific omului si determina holera) si antigene flagelare H.

Patogenitatea vibrionului holerice este determinata de capacitatea mare de multiplicare, acest agent patogen fiind tipic neinvaziv si actionând la poarta de intrare, mai exact asupra epiteliului mucoasei digestive care se exfoliaza. Virulenta acestui agent patogen se datoreaza unor factori, dintre care cei mai importanti sunt toxigeneza si producerea de agresine, din categoria enzimelor. Astfel, tulpinile de vibrioni holerici produc : toxina holerica (care este o exoenterotoxina), toxina Shiga-like, neuraminidaza, lecitinaza, DN-aza (fig. 32,A,B), hemolizine. Tulpinile de *V. cholerae* serogrup O1 produc un CAMP-like factor, evidentiata prin insamântare in striuri, perpendiculare cu striuri ale tulpinii *S. aureus* ATCC , β hemolitice, efectul actiunii lor sinergice fiind hemoliza completa. (fig. 33, A). Specia *V. parahaemolyticus* produce hemolizina Kanagawa, pe mediu agarizat Wagatsuma, cu adaos de 5% hematii de iepure si cristal violet ca inhibitor al bacteriilor Gram pozitive (fig. 33, B). Hemolizina tip Kanagawa indica prezenta concomitenta la tulpina testata a enterotoxinei, fiind indicatorul cel mai fidel al

virulentei tulpinilor de *V. parahaemolyticus*. Recent, s-a demonstrat ca si tulpinile de *V. cholerae* serogrup O1 produc hemolizina Kanagawa (Israil si colab., 2000).

Tabloul clinic al bolii numita holera este de boala diareica secretorie masiva. In cazurile severe bolnavul poate pierde mai mult de un litru de lichid /ora, timp de câteva ore. Lichidul eliminat este incolor, apos, caracteristic (materii fecale cu aspect de «apa de orez»), reflectând o modificare drastica a continutului intestinal. Aceasta modificare este determinata de toxina holerica care este cauza acumularii unei mari cantitati de fluid si electroliti in lumenul intestinal, ca urmare a scaderii reabsorbtiei apei, care are ca efect o diaree profuza, pierderea volumului circulator, acidoza metabolica, depletie de K^+ , colaps vascular conducând spre *exitus*, in lipsa tratamentului. Bolnavul are pielea ridata, uscata, rece, are crampe musculare in brate si picioare si o sete continua; chiar in cazul unui consum mare de lichide, acestea nu pot fi retinute, producerea de urina inceteaza, fluxul sanguin spre creier este diminuat, ceea ce explica intrarea in starea de soc si coma. Evolutia bolii este rapida, durând 2 - 7 zile. Cei care se vindeca ramân purtatori timp de 3 - 6 luni (excreta forme fimbriate). Raspunsul imun este slab, infectia fiind localizata la poarta de intrare; la supravietuitori asigura protectie prin anticorpi, timp de 6 - 18 luni.



Fig. 32 . Teste de evidentiare a unor factori de virulenta caracteristici speciei *Vibrio cholerae* :

- A. Testul de evidentiare a lecitinazei; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu cu galbenus de ou; lecitinaza bacteriana actioneaza asupra lecitinei si elibereaza acid oleic, care in prezenta clorurii de calciu precipita sub forma oleatului de calciu, care apare sub forma unui halou opalescent in jurul culturii; in imagine, tulpinile lecitinaza-pozitive sunt cele din spoturile 1, 3, 4, 5.
- B. Testul de evidentiare a DN-azei; cele 6 tulpini de *V. cholerae* au fost insamântate in spot pe mediu solid cu adaos de ADN (Merck); In jurul culturilor apar halouri clare, datorita hidrolizei ADN la nucleotide libere (spoturile 5 si 6). Primele 4 tulpini prezinta o reactie negativa, evidentiata prin adaugarea unei solutii de HCl 10% in momentul citirii rezultatelor, care precipita ADN.

Diagnosticul de laborator este bacteriologic, urmărindu-se izolarea agentului patogen pe mediu selectiv hipersalin (1 – 5 % Na Cl); în cazurile de holera, prin însămânțarea probei patologice (scaun diareic) se obține o cultură pură de *Vibrio cholerae*. Se efectuează frotiuri (care se colorează Gram) și testul oxidazei, vibriionul holerice fiind Gram negativ și oxidazo-pozitiv. Identificarea se poate face atât prin teste convenționale, cât și cu ajutorul trusei BioMérieux API 20 E, destinată identificării enterobacteriilor, ca și altor bacterii Gram negative, API RapiD 20 E (cu perioada de incubare mai scurtă - 4 ore), API 20 NE. Tulpinile izolate și identificate sunt testate pentru evidențierea factorilor de virulență (toxine și enzime).

Epidemiologie. Sursa de infecție o reprezintă omul sau animalul bolnav (vacă, câini, găini, camila – prin apă contaminată din cocoșă - animalul putând excreta germeni timp de 25 zile de la contaminare). Holera este o boală cu caracter epidemic, epidemia aparând într-o populație virgină din punct de vedere imunologic și cuprinde toate grupele de vârstă, dar mai sensibili sunt copiii și bătrânii, aparținând grupului sanguin O. Adulții imunizați (vaccinul antiholerice a fost inventat și aplicat de către Dr. I. Cantacuzino în România în 1913 și a condus scăderea incidenței bolii) sunt rezistenți sau fac infecții asimptomatice. Transmiterea agentului patogen se face prin ape contaminate cu reziduuri fecaloide menajere (este necesară o anumită doză infectantă), alimente contaminate, cum ar fi: crustacee, fructe de mare neprelucrate termic, pește, orez copt, orez cu sos de alune (cel cu sos de roșii nu transmite), înghețată, linte, fasole, nuci de cocos.

Profilaxia. Se face prin măsuri sanitare de supraveghere a aplicării normelor în vigoare și măsuri de igienă personală, prin vaccinare la populația din zonele endemice, ca și la indivizii care călătoresc în aceste zone. Imunizarea se face cu celule moarte și imunoprotecția conferită de acestea durează aprox. 6 luni. În 1992 cercetătorii de la Universitatea din Maryland (S.U.A.) au identificat genele care codifică enterotoxina și le-au îndepărtat din celulele unei tulpini de *V. cholerae*, care au devenit nepatogene. Astfel de vibrioni vii, atenuați, ar putea fi utilizați ca vaccin, obținându-se o imunoprotecție de lungă durată; un astfel de vaccin se află în stadiul de testare preliminară introducerii în practica medicală. Tot în faza experimentală se află și vaccinurile subunitare, reprezentate fie de subunitatea B a toxinei holerice, fie de antigenele O somatice (LPS). Toxina holerice este studiată și pentru o altă proprietate, anume aceea de a crește imunogenitatea vaccinurilor, fiind în prezent cel mai utilizat imunoadjuvant.

O.M.S. apreciază că holera face anual 5 milioane de victime, ceea ce justifică eforturile care se fac pentru profilaxia acestei boli cu caracter epidemic.



Fig. 33, A,B. Evidențierea unor factori de virulență la tulpini de *V. cholerae* serogrup O1.

- A. Evidențierea CAMP-like factorului, pe mediu cu sânge de oaie 5%, evidențiat prin însămânțare în striuri, perpendiculare cu striuri ale tulpinii *S. aureus* ATCC 25923, β hemolitice, efectul acțiunii lor sinergice fiind hemoliza completă.
- B. Evidențierea hemolizinei Kanagawa, pe mediu agarizat Wagatsuma, cu adaos de 5% hematii de iepure, hemolizina prezentă la specia *V. parahaemolyticus*, dar recent semnalată și la tulpini de *V. cholerae* serogrup O1.

Alte genuri și specii de interes medical ale Fam. *Vibrionaceae* :

Aeromonas sp. – bacterie prezentă în apă, sol, alimente, materii fecale (om și animale); specia *A. hydrophila* – determină infecții ale plagilor, diaree, septicemii la pacienți imunocompromiși.

Plesiomonas shigelloides – bacterie prezentă în apă; poate fi agentul cauzal al gastroenteritei și al unor infecții invazive la pacienți imunocompromiși.

***Campylobacter* sp. și *Helicobacter* sp.**

Microorganisme identificate în prezent ca aparținând speciei *Campylobacter jejuni* au fost descoperite în 1931 de către Jones și colab., ca agenți cauzali ai dizenteriei de iarnă, la vite. În 1957 King a descris un grup de bacili microaerofili, mobili, incurbați, izolați din sângele copiilor cu dizenterie acută, pe care i-a considerat ca fiind înrudiți cu vibrionii (fiind foarte asemănători cu *Vibrio fetus*) și a afirmat că acești vibrioni trebuie să fie foarte înrudiți cu bacteriile descrise de Jones în 1931 și numite de către acesta *Vibrio jejuni* și care ar putea fi cauza sindroamelor diareice de etiologie necunoscută la copii. Această afirmație bazată pe intuiție, nu a fost demonstrată decât 15 ani mai târziu, în 1972 de către Dekeyser și colab., care au izolat bacteriile înrudite cu vibrionii, din materiile fecale ale unor pacienți cu enterită acută,

utilizând tehnica filtrării care a permis bacililor mici, incurbati, sa traverseze membrana care retinuse bacteriile intestinale mari. Ulterior au fost si alte semnalari de cazuri de gastroenterita la om determinate de acesti vibrioni.

Speciile de *Campylobacter* sunt microaerofile (necesita presiuni scazute de oxigen) si capnofile (necesita concentratii mari de dioxid de carbon); sunt bacterii spiralate, mobile cu ajutorul unui flagel polar. Aceste bacterii au un metabolism nefermentativ si neoxidativ, energia necesara rezultând din utilizarea aminoacizilor si a intermediarilor cu 4 si 6 atomi de carbon ai ciclului Krebs. Studiile de biologie moleculara , care au permis stabilirea gradului de omologie a moleculelor de ADN heterologe, au demonstrat ca aceste bacterii nu sunt inrudite cu vibrionii. Specii de *Campylobacter* ocupa o mare varietate de nise ecologice; majoritatea speciilor colonizeaza animalele (bovine, porcine) si pot cauza sterilitate si avorturi. Specia cea mai comuna in laboratorul clinic este *Campylobacter jejuni*.

Pentru stabilirea taxonomiei acestor bacterii (*Campylobacter* si *Helicobacter*), s-au folosit analize de imunotipizare si tehnici moleculare: hibridizarea ADN –ARNr, analiza secventiala a moleculelor de ARNr 16S.

Helicobacter pylori

Istoria descoperirii speciei bacteriene *Helicobacter pylori* (numita inainte *Campylobacter pylori*) este si mai curioasa. Warren si Marshall sunt considerati descoperitorii acestei bacterii (in 1982 – Perth, Australia, descoperire pentru care au primit premiul Nobel pentru medicina, in 2005), totusi existau multe alte descrieri anterioare, datând inca de la sfârșitul secolului al XIX-lea, ale unor microorganisme spiralate evidentiata in probe biotice prelevate din mucoasa gastrica umana. Numai dupa cultivarea cu succes a acestei specii bacteriene, utilizând atmosfera speciala pentru *Campylobacter*, i s-a acordat mai multa atentie, fiind considerata in prezent ca cea mai comuna cauza a infectiilor gastrointestinale umane, ca si a gastritelor; aceasta specie este sensibila la amoxicilina, dar pentru vindecarea bacteriologica sunt necesare 7 zile de tratament.

Mecanismele de patogenitate ale bacteriei *Helicobacter pilory* , responsabile de gastrite cronice si ulcere gastroduodenale, ca si de cancerul gastric, nu sunt pe deplin intelese, totusi se crede ca in virulenta acestei bacterii ar juca un rol important mai multi factori: mobilitatea, activitatea ureazica crescuta (rezulta amoniac, care neutralizeaza HCl, creând conditii favorabile supravietuirii bacteriilor in stomac), producerea de citotoxine (efect cancerigen), ca si aderenta la nivelul unor receptori specifici, evidentiati *in vitro* prin aderenta la diferite linii celulare.

S-a dovedit ca rolul flagelilor este mult mai complex in biologia celulelor bacteriene, prezenta lor la bacteriile patogene constituind un factor de virulenta, prin functia de stimulare a

adeziunii la diferite epitelii și prin capacitatea de a facilita patrunderea prin stratul de mucus ce acopera tesuturile epiteliale.

Rolul lor în virulență este controversat, deși după anumiți autori, capacitatea bacteriilor patogene de a-și modifica poziția în spațiu prin mobilitate activă este de importanță esențială în virulență. Rolul flagelilor în virulență a fost studiat, în special, cu ajutorul mutantelor neflagelate sau al mutantelor “neinteligente” (celule flagelate cu defecte în sistemul de transducție a energiei sau flageli care se rotesc, dar prezintă anomalii de răspuns chemotactic). Mutantele neflagelate sau flagelate, dar nechemotactice de *Campylobacter jejuni*, colonizează mai greu suprafața epitelială decât cele mobile și chemotactice.

În țările dezvoltate se constată în prezent un aparent declin al infecțiilor cu acest agent patogen, datorită modului sau de transmitere de la persoană la persoană și evident, ruperii acestui lanț prin măsuri riguroase de igienă.

Diagnostic de laborator

- **bacteriologic** – evidențierea microscopică a bacteriilor în suc gastric recoltat cu ajutorul sondei gastrice; cultivare în laborator pe medii speciale, în atmosferă de CO₂ și identificare biochimică, utilizând trusa API Campy (cu incubare de 24 ore);

- **imunologic** – teste imunologice rapide pentru *screening*-ul populației cu ajutorul unor truse speciale de teren (*Auro – Dex – H. pylori, U.S.A.*), bazate pe principiul tehnicii ELISA – varianta calitativă, care evidențiază anticorpi specifici în sângele pacientului.

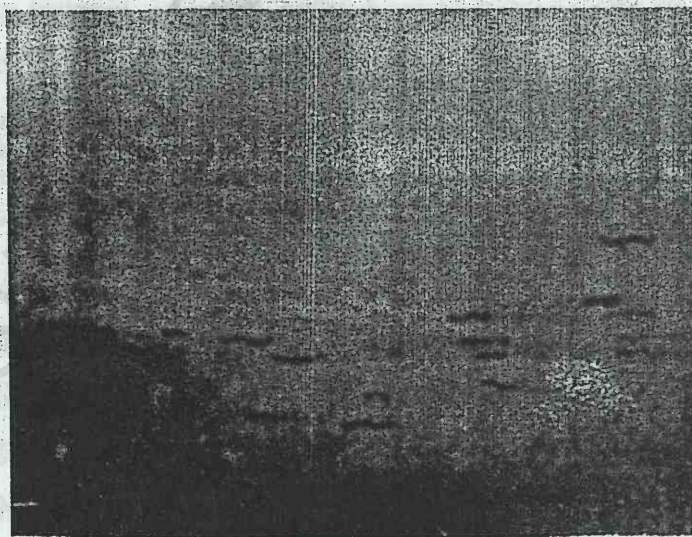


Fig. 34. *Helicobacter pylori*. Imaginea microscopică a bacteriilor de formă sinusoidală (~păsări) evidențiate într-un frotiu din suc gastric (marire : x 1000).

BACILI GRAM NEGATIVI AEROBI

G. *Pseudomonas*

Speciile incadrate in acest gen sunt bacili Gram negativi, drepti sau usor incurbati, nesporogeni, mobili, fiind dotati cu flageli polari monotrihi sau lofotrihi, strict aerobi, catalazo-pozitivi, oxidazo-pozitivi, glucozo-nefermentativi, care reduc nitratii la nitriti si chiar mai departe, pâna la azot molecular (in anaerobioza).

Sunt bacterii frecvente in mediul acvatic si sol (mai ales componente ale rizosferei), pe pietre, lemne, conducte, caracteristica fiind cresterea in microcolonii si biofilme, datorita aderarii lor la substrat prin intermediul glicocalixului, particularitate care le confera rezistenta la fagi, amoebe, substante antimicrobiene.

Specia reprezentativa: *Pseudomonas aeruginosa* are urmatoarele particularitati :

- specia cea mai frecventa, dintre aproximativ 250 specii ale genului;
- bacterie conditionat-patogena, dar care poate determina infectii grave, mai ales la indivizii cu deficit imunitar;
- specia este tipic pigmentogena (piocianina – *in vivo* si pioverdina – *in vitro*), desi exista si tulpini neproducatoare de pigment;
- creste la 42°C ;
- organism foarte adaptabil, cu necesitati nutritive foarte simple, ceea ce explica si caracterul ubicvitar: sol, ape, plante, intestinul uman si animal;
- bacteria este foarte sensibila la uscaciune, dar poate supravietui luni de zile la temperatura camerei;
- se dezvolta bine la interfata lichid-aer (mai ales in spitale, de exemplu in solutii dezinfectante, solutii perfuzabile, sapun hexaclorofenic) ; poate contamina si se poate dezvolta in lotiuni, produse cosmetice, fiind capabila sa se multiplice si in apa distilata, dar nu si in cea bi- si tridistilata ;
- modul de crestere in tesutul infectat este sub forma de microcolonii aderente, mucoide; prin cultivare *in vitro*, tulpinile izolate isi pierd caracterul mucoid.

Factori de virulenta. Capacitatea de adertenta ocupa locul principal la specia *Pseudomonas aeruginosa*, care este un exemplu tipic de bacterie cu multiple structuri adezive. In cazul speciei *Pseudomonas aeruginosa* s-a demonstrat ca tulpinile mobile care infecteaza arsurile sunt mai virulente decât cele imobile. Mai mult, varianta mobila a bacteriei ar fi mai virulenta, formând biofilme la nivelul tesutului pulmonar al bolnavilor cu fibroza chistica, dupa mecanismul descris pentru mediile naturale subacvatice: biofilm alcatuit din microcolonii bacteriene, acoperite de o matrice exopolizaharidica de la marginile careia se elibereaza celule foarte mobile care invadeaza tesutul sanatos.

Patogenie. *P. aeruginosa* este un patogen oportunist care produce complicatii majore la pacientii cu fibroza chistica, dar si o cauza semnificativa a morbiditatii la cei cu arsuri, cancer si

alte boli in care este prezenta imunodepresia. Desi multi produsi extracelulari ai bacteriei contribuie la virulenta sa, structurile filamentoase cunoscute ca pili tip IV, joaca un rol major favorizând aderența bacteriilor la celulele epiteliale.

Virulenta acestui agent patogen nu se manifesta fata de orice gazda, ci in special fata de pacientii spitalizati care vin in contact cu persoane infectate, cu produse patologice (urina, exudat) sau cu diferite obiecte contaminate (vehiculi). Practic, poate fi contaminat cu celule de *Pseudomonas* aderente prin intermediul polizaharidelor capsulare, orice obiect care nu se sterilizeaza prin caldura, cum ar fi: aspiratoare si ventilatoare pentru respiratie asistata, umidificatoare de aer, aparate pentru aerosoli, incubatoare ale nou-nascutilor, obiecte de cauciuc si plastic (chiar daca acestea au suprafete ultrapolisate), pense, termometre, spalatoare de vase si de podea, robinete, plante ornamentale. La infectiile de origine exogena, se adauga si infectiile endogene, cu bacterii de pe tegumente sau din tractul intestinal.

Infectiile cronice ale tractului respirator cu tulpini de *P. aeruginosa* care produc mari cantitati de exopolizaharide mucoide (MEP) = alginati, constituie factorul patogen major al bolilor pulmonare cronice si al mortalitatii prin acestea, la pacientii cu fibroza chistica. Desi se cunoaste putin despre mecanismele care fac bacteria capabila sa initieze infectii la acesti pacienti, aceasta capacitate pare sa fie corelata cu dereglarile in biochimia si fiziologia mucusului respirator al pacientilor si exprimarea adezinelor pentru celulele epiteliale si mucine de catre bacterie. Tulpinile care initiaza infectia sunt fenotipic diferite de cele gasite in infectia cronica (detalii in Cap. Factori de virulenta – Capacitatea de aderența). Anticorpii serici de la pacientii cu fibroza chistica, colonizati in mod cronic, au o capacitate semnificativ redusa de a media omorârea celulelor mucoide de *P. aeruginosa* crescute *in vitro* ca un biofilm pe suprafata unui substrat. Dupa unii autori, alginatul si alte antigene (LPS) ar determina o stimulare policlona la limfocitelor B, care ar avea ca efect hipergamaglobulinemia din cursul fibrozei chistice. Insa severitatea acestei boli se coreleaza invers cu titrul anticorpilor, paradox ce poate fi explicat prin faptul ca acesti anticorpi nu actioneaza ca opsonine cu rol stimulator al fagocitozei, dar contribuie la inflamatiile mediate de complexe imune (reactie de hipersensibilitate tip III).

Succesul oricarui patogen depinde de capacitatea sa de a "simti" mediul de viata si ca raspuns, sa-si moduleze expresia acelor gene necesare pentru stabilirea in noua nisa. Capacitatea de a supravietui in diferite medii reliefeaza importanta intelegerii reglarilor genelor care codifica factorii de virulenta, ca si identificarea semnalelor din mediu implicate. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* a fost recent descris un mecanism reglator al exprimarii genelor, cunoscut ca *autoinductie* sau *quorum sensing*. S-a dovedit ca mecanismul este utilizat si de alti

agenți fito- și zoopatogeni, fiind aproape ubicvitar la bacteriile Gram negative. Acest sistem permite unei populații bacteriene să-și monitorizeze densitatea, cu scopul de a permite inițierea unor procese dependente de densitate. Acest mecanism de *quorum sensing* poate acționa și pentru a asigura la un moment dat producerea unor factori mențiți să contracareze efectorii imunitari ai gazdei. Probabil că dacă *P. aeruginosa* ar fi în organismul gazda la o densitate celulară mică și ar iniția sinteza factorilor de virulență, aceștia ar declanșa răspunsul imun al gazdei și date fiind densitatea celulară mică și, proporțional, concentrația mică a produsilor de virulență, infecția ar fi ușor eliminată. Din contra, dacă producerea factorilor care declanșează răspunsul imun este inițiată când densitatea celulară este mare, infecția poate avea mai multe șanse de a evolua. Gradul mare de corelație între autoinducție și densitatea celulară, dependentă de timp, a condus la adoptarea unei noi terminologii și înlocuirea termenului de autoinducție cu *quorum sensing*.

O altă specie semnificativă pentru patologia umană este *Burkholderia cepacia* (denumirea actuală a speciei *Pseudomonas cepacia*), un agent fitopatogen, dar care determină și la om infecții oportuniste la pacienții imunocompromiși (pneumonii, infecții urinare, endocardite, peritonite, otite, infecții asociate cateterelor). Are o rezistență deosebită la agenții antiseptici și dezinfectanți. Este una din cele două specii de bacili nefermentativi care este lizin-decarboxilazo-pozitivă.

Diagnosticul de laborator

- izolare selectivă pe mediu pentru *Pseudomonas* sp. (cetrimid-agar), examinarea microscopică a preparatelor proaspete L/I pentru evidențierea mobilității și a frotiurilor colorate Gram: evidențiere de bacili Gram negativi, izolați, dreți sau ușor incurbați, cu capete ușor efilate;
- pigmentogeneza: piocianina și pioverdina (pe medii speciale – vezi Anexa IX);
- testarea proprietăților biochimice (testul catalazei, oxidazei, al reducerii nitratilor); teste convenționale sau sisteme microtest (API 20 E – pentru Bacili Gram negativi enterici sau API 20 NE – pentru Bacili Gram negativi non-enterici) care permit identificarea agentului patogen în 24 ore.

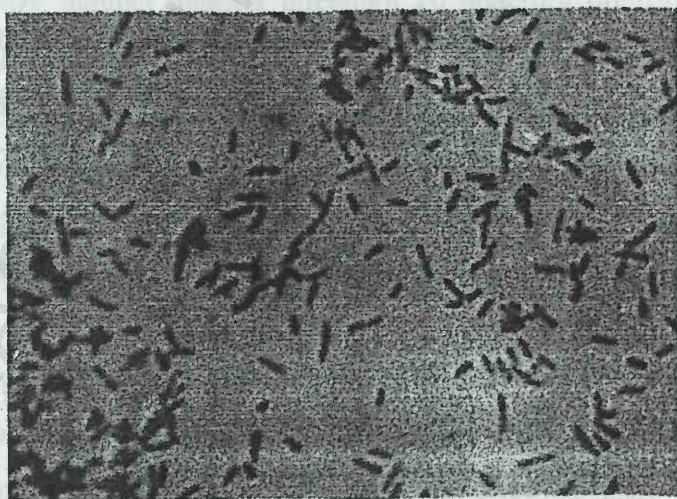


Fig. 35. *Pseudomonas aeruginosa*. Aspect tipic al acestor bacili, mai fini și cu capete efilate, pe un preparat colorat Gram (Mărire: x 1000).

BACTERII ANAEROBE (GRAM POZITIVE SI GRAM NEGATIVE, BACILI SI COCI)

Bacteriile (microorganisme in general) de importanta medicala sunt impartite in trei mari categorii in functie de tipul de metabolism energetic, al reactiilor prin care isi procura energia necesara cresterii si diferitelor activitati metabolice (mai exact in functie de natura acceptorului final de electroni): **bacterii cu respiratie aeroba** (acceptorul final de electroni - oxigenul molecular), **bacterii cu respiratie anaeroba** (acceptorul final de electroni – alti compusi, diferiti de O_2) si **bacterii cu metabolism energetic fermentativ** (proces in care reactiile chimice producatoare de energie necesita prezenta unor compusi organici ca acceptori finali de electroni). In esenta, nevoia de O_2 reflecta mecanismul molecular prin care microorganisme se satisfac nevoile energetice.

Pentru necesitati de ordin practic, pe baza efectului direct pe care oxigenul il are asupra cresterii si metabolismului, microorganisme se grupeaza in patru categorii:

- 1) **Microorganisme strict sau obligat aerobe**- necesita oxigen molecular ca acceptor final de electroni; nu cresc in absenta O_2 . Metabolismul lor energetic este de tip oxidativ. Calea metabolica fermentativa nu este folosita pentru ca nu poate genera cantitatea de energie necesara sintezei compusilor celulari din categoria acizilor grasi prezenti in structura acestor bacterii. Exemple de bacterii strict aerobe: *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, *Mycobacterium tuberculosis* etc.
- 2) **Microorganisme strict sau obligat anaerobe** – nu se pot dezvolta in prezenta O_2 si care pot fi cultivate numai in medii saracite in O_2 , deoarece chiar la presiuni joase acesta poate avea efect inhibitor; in practica se folosesc diferite metode pentru asigurarea anaerobiozei. In aceasta categorie intra exclusiv bacterii. Oxigenul este toxic pentru bacteriile anaerobe (mecanismul nu este elucidat, dar se presupune ca sunt generati produsi de reducere ai oxigenului, cum ar fi peroxidul de hidrogen (H_2O_2), ionul superoxid (O_2^-), ionul oxidril ($HO^\cdot$), oxigenul singlet ($^1O_2$); la bacteriile moderat anaerobe (care tolereaza o cantitate mica de O_2 in mediul de crestere – 2 - 5%) exista nivele scazute de enzime protectoare (catalaza, superoxid-dismutaza = SOD); fata de ionul oxidril ($HO^\cdot$) si oxigenul singlet ($^1O_2$) nu exista mecanisme enzimatice de contracarare.

Exemple de bacterii strict anaerobe: *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens* etc.

- 3) **Microorganisme aerobe, facultativ anaerobe** - isi pot obtine energia necesara cresterii, pe cale oxidativa, folosind O_2 ca acceptor final de electroni, dar aceste microorganisme pot creste si in absenta O_2 , obtinând energia necesara pe cale fermentativa; unele desfasoara un metabolism de tip fermentativ (bacterii lactice), chiar in prezenta aerului, fara a fi sensibile

la O_2 ; altele, cum ar fi levurile, *E.coli* si intreg grupul enterobacteriilor, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Vibrio sp.*, sunt capabile sa-si orienteze metabolismul spre respiratie sau fermentatie, in functie de conditiile de mediu (de presiunea relativa a O_2).

- 4) **Microorganisme microaerofile** – cresc cel mai bine la presiuni de O_2 mai mici ($\sim 0,2$ atm) decât in aerul atmosferic. Aceasta particularitate reflecta prezenta unor enzime care sunt inactivate in conditii de oxigenare puternica si pot fi mentinute in stare functionala numai la presiuni joase de O_2 . Ex: *Spirochetes*, *Campylobacter*, *Helicobacter* etc.

Un numar de aprox. 300 de specii de bacterii anaerobe sunt prezente in cavitatea bucala, iar in alte cavitati au fost izolate si identificate aprox. 500 de specii.

In 1861 Pasteur descoperea agentul de fermentare al acidului butiric – *Clostridium butyricum*, pornind de la observatia ca in mijlocul lamelei germenii aveau miscari rapide, pe când la marginile lamelei miscarile erau foarte lente pentru ca la acest nivel patrundea aerul. De asemenea, a constatat ca daca intr-o cultura in plina dezvoltare, care produce si o mare cantitate de gaze, introducea aer, fermentatia se oprea. A emis ipoteza potrivit careia fermentul butiric ar fi fost un infuzor prezent in medii fara oxigen liber, acesta fiind preluat din diferiti compusi.

In 1877 Pasteur a descoperit agentul patogen *Clostridium septicum*. La inceputul secolului XX, s-au descoperit in serie alti agenti patogeni anaerobi. Acestia au fost clasificati in **anaerobi telurici**, sporogeni, apartinând genului *Clostridium* si **anaerobi endogeni**, componentii ai microbiotei normale a organismului uman si animal. In ultimele decenii ale secolului XX s-a inregistrat o adevratata explozie a informatiilor despre anaerobi, mai ales datorita imbunatatirii tehnicilor de lucru si de mentinere a conditiei de anaerobioza, dar si datorita faptului ca medicina moderna favorizeaza indirect aparitia infectiilor cu anaerobi oportunisti, prin actul chirurgical pe abdomen in special, dar si ca urmare a antibioteratiei cu streptomycin sau gentamicina, antibiotice care inhiba germenii aerobi, nu si pe cei anaerobi, sau a imunosupresiei organismului consecutiva corticoterapiei. Dupa introducerea in protocolul terapeutic a metronidazolului , care inhiba eficient anaerobii, administrat preoperator cu scopul profilaxiei infectiilor postoperatorii cu anaerobi, in anii '70 s-a descoperit ca acest antibiotic in cantitati mari are actiune cancerigena la animalele de laborator.

Habitat. Habitatul bacteriilor anaerobe cu potential patogen este diferit, in functie de capacitatea lor de sporogeneza si implicit, de rezistenta la conditiile mediului extern:

Anaerobii sporulati- sunt membri predominanti ai microbiotei telurice, prezenti in sol, unde supravietuiesc sub forma de spori. S-a cercetat prezenta si viabilitatea sporilor in soluri nelucrate de sute de ani si la adancimea de 1-2 m s-au gasit spori viabili, ceea ce demonstreaza ca solul mentine

viabilitatea lor perioade îndelungate. Bacteriile patogene sporulate se găsesc și în tractul digestiv al animalelor și omului, unde ajung odată cu alimentele de origine vegetală. Tubul digestiv oferă un mediu prielnic creșterii și multiplicării celulelor de *Clostridium*. Din intestin, acestea sunt eliminate cu materiile fecale și ajung în sol. *Circuitul entero-teluric* este o adaptare care permite anaerobilor telurici să se multiplice în tubul digestiv și să se conserve în sol, datorită capacității de sporulare. Întreruperea acestui ciclu și declanșarea unei infecții se produce cu o frecvență scăzută.

În această categorie este inclus *G. Clostridium*, cu peste 120 de specii sporogene de bacili anaerobi Gram pozitivi, cu semnificație clinică:

În cadrul genului *Clostridium*, patru specii sunt aerotolerante și pot fi dificil de diferențiat de alți bacili aerobi. Clostridiile aerotolerante nu formează spori în condiții aerobe și produc colonii mai mari în condiții anaerobe. Clostridiile capabile să crească pe medii îmbogățite în aer sunt: *C. tertium*, *C. histolyticum*, *C. carnis*, *C. durum*. Clostridiile aerotolerante pot fi confundate cu alți bacili, aerobi facultativ anaerobi, mai ales cu lactobacilii pentru că, asemenea acestora, sunt catalază-negative și nu formează spori când cresc în condiții aerobe.

Sunt dificil de detectat spori la unele specii de clostridii, cum ar fi *C. ramosum*, *C. clostridioforme* și alte specii. Totuși majoritatea tulpinilor acestor specii sunt rezistente la încălzire și tratarea cu alcool care omorâă celulele vegetative, dar nu și spori. Chiar dacă *C. clostridioforme* și alte specii se colorează ca bacili Gram negativi, totuși sunt sensibili la vancomicină, care confirmă caracterul lor Gram pozitiv.

Anaerobii nesporulați sunt dublu condiționat patogeni, pentru declanșarea unei infecții fiind necesare condițiile de anaerobioză și imunodepresie. Aceste bacterii se găsesc numai în organismul animal și al omului, făcând parte din microbiota endogenă rezidentă, stabilă a organismului, prezenta pe piele, mucoasa bucală, tractul digestiv, mucoasa uretrală și vaginală. Se pot localiza în toate regiunile corpului. Anaerobii nesporulați aparțin următoarelor genuri mai importante:

- *G. Actinomyces*
- *G. Bifidobacterium*
- *G. Eubacterium*
- *G. Lactobacillus*
- *G. Propionibacterium*

Dacă anumite specii de *Clostridium* sunt producătoare de toxine, infecții și boli grave, bacilii nesporogeni sunt prezenți în mod normal în infecții cronice. Deși aceste specii sunt clasificate ca anaerobe, majoritatea speciilor de *Actinomyces* și mulți lactobacili sunt facultativ anaerobi cu creștere lentă.

Membrii microbiotei normale sunt patogeni oportunisti, manifestându-se potențialul patogen mai ales după antibioterapie, putând genera infecții, cum ar fi apendicita și peritonita, colecistita, bacteriemie, iar transportul lor în organism poate conduce la infecții cu diferite localizări. În infecțiile cu anaerobi nesporulați diagnosticul bacteriologic este necesar, boala fiind dificil de reprodus experimental. Sunt insensibili la penicilina, astfel ca în cazurile de infecții cu anaerobi nesporulați este necesară antibiograma. Dacă este o infecție mixtă, medicația este greu de stabilit, necesitând un antibiotic pentru anaerobi și unul pentru aerobi, sau un antibiotic cu acțiune universală, cum este de exemplu cloramfenicolul. Acest antibiotic este însă foarte toxic, administrat în cantitate mare și o perioadă lungă de timp, având efecte secundare severe: alterează mitocondriile, inhibă sinteza imunoglobulinelor, inhibă eritropoeza și în cele din urmă determină aplazie medulară ireversibilă. Un derivat al cloramfenicolului, tiamfenicolul este eficient și utilizarea sa nu este însoțită de aceste efecte toxice.

Patogenitate.

Bacteriile anaerobe sporulate sunt condiționat patogene, necesitând condiții de anaerobioză pentru a iniția un proces infecțios. Bolile determinate de bacteriile anaerobe exogene includ: botulismul alimentar, de ranire și infantil (agentul patogen fiind *Clostridium botulinum*), gastroenterita necrozantă, tetanos, gangrena gazoasă (mionecroza), infecții ale ranilor prin muscatura, contaminare cu sol, septicemii *post abortum*.

Genul *Clostridium* cuprinde aproximativ 120 de specii de bacili telurici, mobili, cu flageli peritrichi, Gram pozitivi (devin Gram negativi în culturi mai vechi de 18 h), sporogeni cu spori deformanți, condiționat patogeni, producători de exotoxine. Toleră expunerea la O_2 fără ca celulele să moară, pentru că au enzime inactivatoare. Nu realizează reducerea dezasimilatoare a ionilor SO_4^{2-} . Sunt prezenți în sol, dar majoritatea există și în microbiota normală (cu excepția speciei *C. botulinum*).

C. botulinum - agentul patogen al botulismului (foarte rar întâlnit, deoarece apar condiționari pentru producerea sa), determinat de toxina botulinică, preformată în alimente. Cea mai puternică toxină biologică, care determină o inhibare a sinapselor excitatorii ale plăcii motorii și paralizie flascată. Botulismul de ranire și infantil a demonstrat că aceste bacterii se pot multiplica și în țesuturile vii. Bacteriile sunt prezente în sol și în materiile fecale, deși nu sunt componente ale microbiotei intestinale, provenind din spori ingerați odată cu alimentele.

C. tetani - bacterie Gram pozitivă, cu aspect de bat de chibrit (racheta de tenis) datorită sporului terminal deformant (fig. 36). Este o bacterie mobilă, pe suprafața mediului solid

deplasându-se ca și *Proteus*. La izolare este anaeroba, dar prin pasaje succesive devine aeroba și nu mai produce toxina. Prezent în sol, ajunge odată cu furajele în tubul digestiv și se multiplica în rumenul bovinelor. Imbolnavirile au o frecvență mare, la persoanele care prezintă leziuni care vin în contact cu sol amestecat cu balegar; la locul leziunii bacteriile se multiplica.

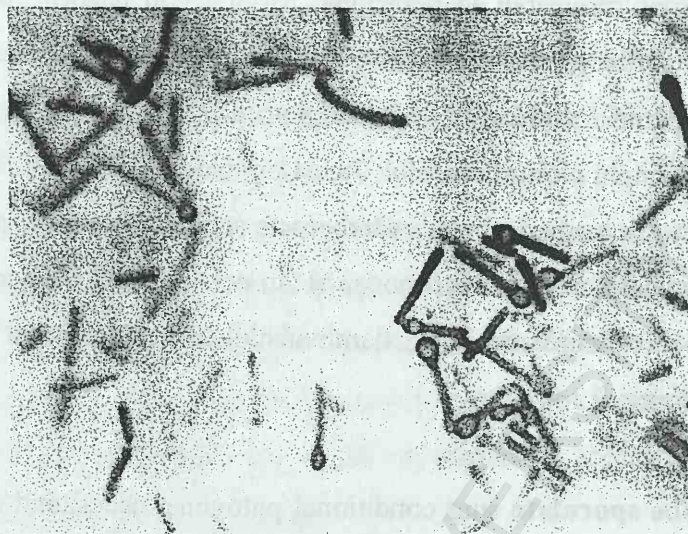


Fig. 36. *Clostridium tetani*. Imagine microscopica a unui frotiu colorat Gram, efectuat din produs patologic recoltat dintr-o plaga infectată a piciorului; se observă bacili tetanici sporulați, sporii terminali deformanți (necolorați) determinând aspectul tipic al acestor bacili, de „bat de chibrit” (marire: x 1000).

Toxina tetanică a fost prima exotoxină tratată cu formol și transformată în anatoxină (Ramon, 1930). *In vivo*, toxina determină o excitare a componentei postsinaptice a motoneuronilor spinali și starea de tetanos sau paralizie spastică. În România există o incidență de 20 – 30 cazuri de tetanos /an datorită ineficienței vaccinului. După tetanos, nu se produce imunizarea, pentru că toxina produsă *in vivo* este în concentrație mică. Serul imun antitoxina este eficient dacă este administrat înainte ca toxina să se lege de receptori din sistemul nervos central.

Clostridii histotoxice - determină infecții (exogene) ale ranilor și infecții de origine endogenă, cu bacterii provenite din microbiota rezidentă, ajunsă la nivelul țesutului lezat, pe calea fluxului sanguin. Infecțiile ranilor sunt simple contaminări - când germenul nu depășește poarta de intrare, dar pot evolua și spre infecții propriu-zise: de exemplu, *celulita* sau *necroza* țesuturilor de multiplicare sau *mionecroza*, în care germenii se extind în teritorii musculare largi, neavariate de traume. Clostridiile histotoxice produc enzime de soc; ex.: *C. perfringens*, *C. novyi* (*C. oedematiens*), *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. bifermentans*. Uneori sunt asociați mai mulți germeni, cu necroza musculară, producere de gaz, toxemie. Cea mai mare frecvență o are *C. perfringens*, care se prezintă sub formă de bacili Gram pozitivi, izolați, scurți și groși, cu capete rotunjite (fig. 37) care

nu sporuleaza decât *in vitro*, fermenteaza zaharurile cu producere de gaze. Exista in sol, ape uzate, aer, pe obiecte, dar si pe suprafata corpului si in intestin ($10^4 - 10^{10}$ celule/g continut colonic), fiind un agent conditionat-patogen. Produce numeroase toxine solubile si enzime: fosfolipaza = lecitinaza, collagenaza, hemolizina, proteaze (hidrolizeaza gelatina), dezoxiribonucleaze. Inocularea intramusculara experimentală produce topirea tesuturilor. Tulpinile de *C. perfringens* se clasifica in 5 toxinotipuri (A, B, C, D si E), clasificare bazata pe producerea a 4 toxine majore (α , β , ϵ si θ), fiecare dintre ele inducând un sindrom specific. Identificarea corecta a acestora este necesara pentru studiile epidemiologice si pentru dezvoltarea unor masuri protectoare eficiente, incluzând si vaccinarea. Aceste toxine sunt secretate in mediu in timpul fazei exponentiale de crestere. *C. perfringens* tipul A este ubicvitar si cel mai comun toxinotip in mediu, ca si agentul cauzal al gangrenei gazoase la om, determinata in principal de toxina α si secundar de toxina θ si enzime hidrolitice. Tipul A este asociat si cu intoxicatia alimentara la om.

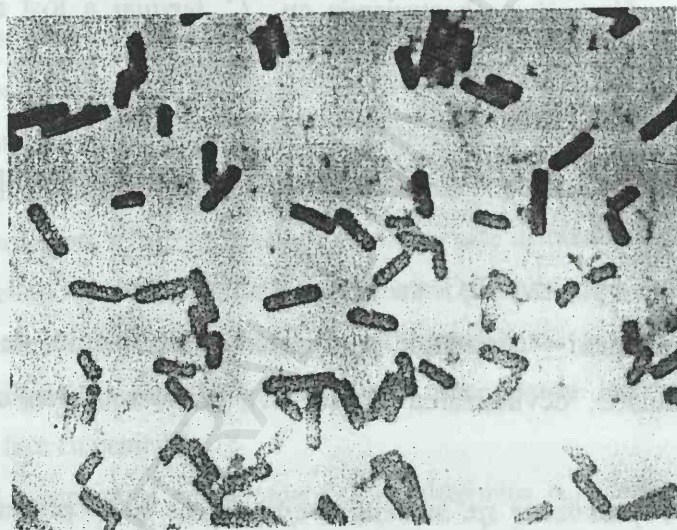


Fig. 37. *Clostridium perfringens*. Imagine microscopica a unui frotiu colorat Gram, efectuat dintr-o cultura pura, in care se observa bacili Gram pozitivi, izolati, scurți si grosi, cu capete rotunjite, nesporulati (marire : x 1000).

Specia *C. perfringens* nu este invaziva; produce si toxiinfecții alimentare, consecutive de exemplu schimbarii dietei, care au insa o frecventa mai mica comparativ cu cele determinate de *Salmonella sp.* si o evolutie rapida, benigna. Celulele se multiplica in alimente. Enterotoxina nu este preformata, pentru ca se formeaza in momentul sporularii. Toxina determina accentuarea motilitatii digestive, diaree, inversarea transportului apei, Na, Cl (nu este implicat mecanismul adenilatciclazei). Toxinele pot fi si cauza enteritei necrozante. Enterotoxemia se datoreaza multiplicarii rapide a germenului intestinal.

C. perfringens este factorul cheie in etiologia enterocolitei necrozante, datorata fie germenilor microbiotei intestinale, fie celor exogeni (de ex, din carnea de porc). Se produce paralizia muschilor netezi intestinali si necroza in jejun. Factori favorizanti: excesul de alimente, ischemie locala, subnutritia care este cauza scaderii secretiei de enzime pancreatice care scindeaza toxina, prezenta unor inhibitori ai tripsinei, aceasta enzima fiind activa la pH acid (de ex. –in cazul unui consum de legume in exces, pH-ul sucului gastric devine alcalin).

C. perfringens este si principalul anaerob acceptat ca un indicator bacteriologic al poluarii fecaloide a apei.

C. septicum determina infectii frecvent asociate cu carcinomul colorectal, cu o rata mare a mortalitatii. Poate fi izolat din sânge sau plagi infectate. Prezenta sa in culturi este adesea primul semn ca un carcinom poate fi prezent. Izolarea clostridiilor din sânge in absenta semnelor clinice de boala, poate fi un eveniment trecator si necorelat neaparat cu boala, cu exceptia speciei *C. septicum*.

Clostridii aerotolerante: *C. tertium* (bacteriemia cu *C. tertium* a fost raportata la pacienti cu neutropenie si boli hematologice maligne), *C. histolyticum*, *C. durum*, *C. difficile* (o specie endogena, normal supresata, printr-un efect de bariera permisiva, care determina colita pseudomembranoasa, colita insotita de diaree la copii si adulti, postantibiotapie).

Bacteriile anaerobe nesporulate

-coci si bacili, Gram pozitivi si Gram negativi (dintre care cei mai importanti sunt bacili); sunt dublu conditionat patogeni – necesitând pentru dezvoltare conditii de anaerobioza in tesuturi (prin modificari de circulatie, devitalizarea tesuturilor), ca si scaderea capacitatii de aparare a organismului-gazda.

Coci Gram pozitivi – *Peptococcus sp.* si *Peptostreptococcus sp.* – prezenti pe piele, in cavitatea bucala, caile genito-urinare; determina hidrosadenite, chisturi dermoide, ulcere ischemice la persoane imunodeprimate. Infectii mixte, cu efect necrozant al tesuturilor: *Peptococcus-Bacteroides*.

Coci Gram negativi – prezenti in cavitatea bucala, caile respiratorii superioare si genitale. Ex. *G. Veionella*, asemanator cu *Neisseria sp.*

Bacili Gram pozitivi – fac parte din microbiota normala in majoritate; in cavitatea bucala au densitatea de 10^7 - 10^9 celule/ml saliva; 10^{10} - 10^{12} celule /g continut colonic. Sunt prezenti si in caile respiratorii superioare, caile genito-urinare, intestin. Determina leziuni necrozante, febra puerperala, colite ulcerante, abcese, septicemii. Frecvent se asociaza mai multi germeni in procesul infectios (de ex. in perforatiile apendicelui). Nu toate speciile au potential patogen.

Specii patogene:

-*Actinomyces sp.*: *A. odontolyticus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sunt specii implicate în boala periodontală; alte specii produc actinomicoze cervico-faciale, pulmonare, abdominale, abcese cerebrale, hepatice, pulmonare, endocardite, periodontite, infecții datorate înțepăturilor de insecte.

Speciile de *Actinomyces* sunt anaerobe și comensale ale cavităților naturale la om și animale (mamifere); niciodată izolate din sol, aceste specii pot fi condiționat-patogene, fiind agenții actinomicozei cervicofaciale la om și animale. Aceasta localizare cervicofacială și cerebrală este predominantă (50% din cazuri), urmată de localizarea abdominală (apendice perforat, ulcer perforat), toracală (pleurezie) și alte localizări mai puțin frecvente. Infecțiile provocate sunt puțin contagioase, în mod asemănător cu cele provocate de alte bacterii strict anaerobe. Dezvoltarea bacteriilor și infecția consecutivă este favorizată de:

- contuzii ale tesuturilor, cum sunt cele provocate de extracțiile dentare și fracturi ale maxilarului;
- stază la nivelul canalelor excretorii, provocată de ex. de litiază renală;
- prezența altor germeni anaerobi (de ex. fuzobacterii și spirochete);
- corticoterapie, care determină un efect de imunosupresie.

Infecția se poate extinde în tesuturile și organele vecine prin contiguitate, ca și pe cale sanguină (nu și pe cale limfatică). O reacție de scleroză a tesuturilor învecinate limitează propagarea infecției, dar favorizează supraviețuirea germenilor datorită mediului anaerob creat și limitării patrunderii antibioticelor. Procesul de necroză apărut în interiorul unei leziuni deja sclerozate, conduce la formarea unui abces și explică recidivele, necesitatea unor tratamente prelungite cu antibiotice și, de multe ori, a unei intervenții chirurgicale.

Actinomyces israeli (*A. bovis*) este o specie de bacili ramificați, prezenți pe dinții cariati, ca și în criptele amigdalene, constituind focare inflamatorii cronice. Poate determina leziuni subcutanate ale regiunii cervico-faciale și fistule ale acestora, prin care se elimină granule galbene sau albicioase (asemănătoare incluziilor de sulf, formate din germeni înglobați într-un depozit lipidic provenit din tesuturile gazdei). Alte localizări: respiratorie, digestivă, genitală, rinichi, ficat, oase, glande lacrimale, sistem nervos central. Tratamentul etiologic se face cu penicilină.

Eubacterium sp. – împreună cu *Actinomyces sp.* determină o infecție mixtă, numită actinomicoză pelvică, favorizată de utilizarea dispozitivelor contraceptive intrauterine;

Bifidobacterium denticum – izolat din infecții pulmonare;

Propionibacterium acnes component al microbiotei tegumentelor, dar și a tractului intestinal, respirator superior (mai ales a narilor), urogenital. Datorită prezenței lor pe piele, propionibacteriile sunt adesea contaminanți ai probelor de sânge sau a altor fluide ale corpului recoltate prin puncționarea pielii. Izolarea repetată din probe de sânge sugerează că bacteria poate avea semnificație clinică. Tulpini ale acestei specii au fost implicate în infecții ale ulcerelor corneene, valvulelor cardiace și dispozitivelor protetice (articulații artificiale) și sunturilor ventriculare. Aceste infecții pot conduce la osteomielită, bacteriemie, endocardită și meningită – anumite tulpini, care determină acnee, produc lipază, care determină eliberarea acizilor grași din trigliceridele sebumului, care sunt iritanți și comedogeni. Produce și alte enzime: hialuronidază, condroitin-sulfatază, neuraminidază. Catalază-pozitiv și indol-pozitiv (teste utile identificării

prezumtive.), speciile de *Propionibacterium* sunt adesea numite “difteromorfi anaerobi” pentru ca bacili sunt neregulați, pleomorfi și adesea grupați în “cluburi”.

P. propionicum – agentul cauzal major al actinomicozei.

Bacili Gram negativi

- *Bacteroides* sp.- *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. theta*, *B. asaccharolyticus*; cresc în medii cu 3% O₂, își mențin viabilitatea chiar 20 min în aer (aerotolerante); determină peritonite, pot trece în sânge. Posedă catalază și SOD care fac posibilă diseminarea germinului pe cale sanguină. Suportă concentrația de oxigen tisular. Au material capsular, lipaze, β-lactamază, proteaze. Uneori în infecții apare în stare pură, dar frecvent este izolat din infecții mixte. Determină frecvent infecții la pacienții cu SIDA.
- *Bacteroides* sp. - speciile nepatogene din microbiota normală desfășoară procese fermentative (nu sunt celulozolitice, dar se dezvoltă pe seama acestora);
- *Fusobacterium* sp. – *F. nucleatum* – microbiota orală- specie condiționat-patogenă;
 - *F. necrophorum* – microbiota normală a intestinului gros; specie prezentă pe mucoasa bucală, în placă dentară; determină infecții pleuropulmonare; se asociază cu *B. fragilis*; infecțioasă și la animale (necrobaciloza hepatică).
- *Porphyromonas gingivalis* și *Prevotella melaninogenica*. (pigmentogene, asociate cu *Bacteroides* sp.); specii implicate în boala parodontală;
- *Leptotrichia buccalis* = bacilul fusiform al lui Vincent – bacterii Gram negative strict anaerobe nesporogene.

Diagnosticul de laborator

-bacteriologic - metode de cultivare în anaerobioză: fizice, chimice, biologice, combinate; mai utilizate sunt:

- metoda clasică a plicului cu pirogalol: 0,4 g pirogalol, 0,4 g Na₂ CO₃, 4g talc, într-un plic de hârtie de filtru, fixat pe capacul plăcii, deasupra căruia se așează placa însemăntată, care se fixează cu parafină topită;
- metoda Gas Pak – recipient ermetic închis + plicuri speciale (tip *BBL Gas Pak*) cu anumite substanțe și un catalizator de paladiu; la adăugarea de apă în momentul folosirii, substanțele reacționează și generează H₂ și CO₂; indicator al potențialului redox al mediului- benzi de hârtie de filtru imbibate cu albastru de metilen; în mediu reductor, hârtia trebuie să fie albastră;
- incubatoare cu CO₂.
- examenul caracterelor de cultură (de ex. *C. septicum* formează pe geloză-sânge colonii cu aspect tipic – „cap de meduză”- fig. 38) și microscopic pe preparate colorate Gram (*C. clostridioforme* și alte specii se colorează ca și Gram negativi; sensibilitatea la vancomicină este un test de

- confirmare a caracterului Gram pozitiv), ca si pentru evidentierea sporilor (metoda Benito-Trujillo cu verde malachit);
- teste biochimice, de ex.: **bacilii Gram pozitivi nesporogeni**, din microbiota normala, care au un potential patogen scazut, fiind rar izolati in cultura pura (frecvent dau infectii mixte), pot fi diferentiati pe baza produsilor metabolici rezultati prin cultivarea lor pe medii speciale:
 - *Propionibacterium sp* produce acid propionic si acetic+/- lactic;
 - *Bifidobacterium sp.* produce acid acetic si lactic (acid acetic in cantitate mai mare);
 - *Lactobacillus sp.* produce acid lactic- produs final major;
 - *Actinomyces sp.* – produsul major este acidul succinic+/- acid acetic sau lactic;
- identificare cu **sistemul microtest tip API 20 A** (pentru anaerobi sporulati si nesporulati) sau API Coryne (pentru *Actinomyces sp.*, *Propionibacterium sp.*)
- teste utile identificarii speciei *C. perfringens* (bacil scurt, gros, capsulat);
- **testul hemolizei si evidentierea CAMP-factorului** (fig. 39), pe geloza-sânge;
- **testul lecitinazei** (opacifierea mediului in jurul coloniilor), **reactia de semineutralizare a toxinei prin testul Nagler** (fig. 40) si **producerea cheagului alveolar in lapte turnesolat**, sunt teste pozitive, importante pentru identificarea acestei specii care determina infectii cu mortalitate mare, chiar sub tratament cu antibiotice (50 – 70%).



Fig. 38. *Clostridium septicum* pe geloza-sânge dupa 8 ore de incubare: colonii “cap de meduza”.

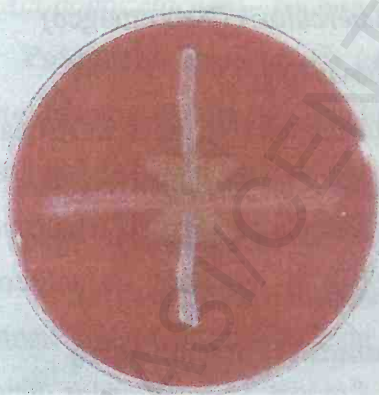


Fig. 39. Test CAMP – pozitiv - efect sinergic, de hemoliza completa in forma de sageata, produsa la incrucisarea culturilor in striuri perpendiculare a unor tulpini de *Clostridium perfringens* si *Streptococcus agalactiae*.

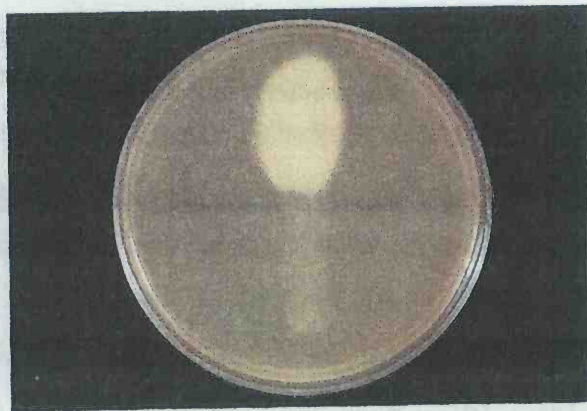


Fig. 40. Testul Nagler – reactia de semineutralizare a lecitinazei (pe mediu cu galbenus de ou) data de *C. perfringens* (insamântat in striu median), in prezenta unui ser imun anti-toxina incorporat in mediu si care (in partea de jos a placii) impiedica reactia obisnuita de opacifiere a mediului, datorata precipitarii acizilor grasi rezultati din degradarea lecitinei (sus).

BACILI ACIDOALCOOLOREZISTENTI

Mycobacterium tuberculosis

Bacteria *Mycobacterium tuberculosis* a fost izolată în 1881, de către R. Koch, fiind cunoscută și sub numele de „bacilul Koch” (B.K.). Tuberculoza era cunoscută însă dinainte; săpăturile arheologice au scos la iveală probe care demonstrează prezența acestei boli în patologia umană chiar în urmă cu 6000 de ani. Boala afectează nu numai specia umană, ci și specii animale; timp de mulți ani, până la descoperirea substanțelor chemoterapeutice și antibiotice tuberculicide (hidrazida acidului izonicotinic -HIN, rifampicina) a fost considerată o boală fără remedii. În cursul bolii, se produc noduli pulmonari, vizibili prin RX ca ~tuberculi, de unde denumirea de tuberculoză. Agentul patogen poate disemina în organism (oase, ficat, rinichi, organe genitale) – complicație numită tuberculoză miliară (lat. *milium* = samântă). Tuberculoza este o boală consumptivă (agentul patogen distruge țesutul afectat), care în prezent este considerată o boală vindecabilă, dacă beneficiază de un tratament corespunzător (medicamentos și igienă-dietetic), cu excepția cazurilor când agentul patogen este polichimiorezistent, situații în care boala poate avea sfârșit letal.

Incadrare taxonomică: Cls. *THALLOBACTERIA* (*Actinobacteria* = *Actinomycetes*)
Ord. *ACTINOMYCETALES*
Fam. *MYCOBACTERIACEAE*

Genul *MYCOBACTERIUM* ~ 70 de specii care se diferențiază după gradul de patogenitate și după capacitatea de pigmentogeneză în două grupe:

Complexul *Mycobacterium tuberculosis* – *M. tuberculosis* (Necromogen)

(micobacterii tuberculoase)

- *M. bovis* (N)
- *M. africanum* (N), izolat în Africa

Micobacterii netuberculoase condiționat-patogene – *M. fortuitum* } creștere

- *M. chelonae* } rapidă

- *M. avium-intracellulare* (N)
- *M. kansasii* (Fotocromogen)
- *M. scrofulaceum* (Scotocromogen)
- *M. ulcerans* (N)
- *M. marinum* (F)
- *M. xenopi* (Scotocromogen)

Aceste specii de micobacterii netuberculoase, numite si atipice sau paratuberculoase, pot fi prezente la om si la animale, ca specii comensale pe piele si mucoase, ca si in mediul natural ca specii saprotofe .

Caractere generale. *M. tuberculosis* se prezinta sub forma unor bacili incurbati – 0,3 – 0,4 μm / 1 μm , imobili, grupati in perechi sau in corzi (grupare determinata de prezenta cord-factorului in peretele celular), acidoalcoolorezistenti (AAR), obligat aerobi, cu capacitati de crestere si multiplicare lente. Speciile netuberculoase au o morfologie asemanatoare cu bacilul Koch .

Toate micobacteriile au un perete celular structurat asemanator, bogat in lipide. La microscopul electronic au fost evidentiata doua straturi strâns unite: 1) stratul intern care este compus din mucopeptide (mureina), confera rezistenta la liza si substante chemoterapeutice si determina forma celulelor; 2) stratul extern este compus din polipeptide si lipide: ceruri, fosfolipide, glicolipide (cord-factorul, care este si factor de virulenta), acizi micolici si micozide (dimicolat de trehaloza, care pot fi si receptori de fagi). Partea lipidica este expusa spre exterior; 60% din aceasta este reprezentata de acizii micolici care confera suprafetei celulare o hidrofobie marcata, cu un efect de evitare a patrunderii apei, acizilor, alcalilor si solventilor (alcooli si eteri). In timpul coloratiei diferentiale Ziehl-Nielsen, incalzirea realizeaza permealizarea peretelui celular, facilitând patrunderea colorantului; la racire, peretele celular revine la structura dinainte si colorantul nu mai poate fi scos de acizi si alcooli. Coloratia fluorescenta se bazeaza pe acelasi principiu. Acizii micolici sunt prezenti si la micobacteriile atipice, la *Nocardia sp.* (din Fam. *Actinomycetaceae*) - bacterii prezente si in tartrul dentar, ca si la *Corynebacterium sp.*

Patogenie. Expectoratia celor bolnavi sub forma de picaturi contine bacterii care sunt inhalate de catre cei din jur. Bacilul tuberculos nu produce toxine. Virulenta sa se datoreaza mai ales faptului ca este o bacterie parazita facultativ intracelular, care supravietuieste si se multiplica in macrofage, datorita producerii unei “proteine repetitive exportate” care impiedica fuziunea fagozomilor cu lizozomii si astfel nu poate fi degradata de enzimele lizozomale (chiar la persoanele tratate cu tuberculicide si vindecate din punct de vedere clinic, ramâne un numar mic de bacili tuberculosi in macrofage, care vor putea determina o recadere, când rezistenta organismului-gazda va fi mai scazuta, ceea ce demonstreaza caracterul de germeni oportunisti).

Infectia si boala se produc doar prin contact repetat si prelungit, bacilul tuberculos fiind un agent conditionat-patogen sau oportunist. In prezent se remarca tendinta de diseminare a agentului patogen in organism, care poate determina: tuberculoza pulmonara, dar si renala, genitala, osoasa (osteomielita tuberculoasa). Manifestarile tuberculozei pulmonare: anorexie,

astenie, febra, transpirație nocturnă, stare generală alterată, scădere ponderală, tuse și hemoptizii. Leziunile sunt dependente de răspunsul imun al gazdei (mediat celular). Leziunile pot fi de două tipuri: 1) *exudative* (răspuns inflamator acut la nivelul plămânilor) și 2) *granulomatoase*; acestea constau într-o zonă centrală de celule gigantice care conțin bacili tuberculoși, înconjurată de o zonă cu celule epitelioide. Un *tubercol* este un granulom înconjurat de țesut fibros care delimitează o zonă centrală de necroză caseificată. Tubercolii se vindecă prin fibrozare și calcificare. Se consideră că majoritatea infecțiilor (90%) sunt asimptomatice.

Patru pe cale digestivă, agentul patogen este distrus în mod normal de aciditatea gastrică. Tuberculoza gastrointestinală poate fi și cauza consumului de lapte nepasteurizat, provenit de la o vacă bolnavă de tuberculoză, agentul infecțios (*Mycobacterium bovis*) fiind eliminat prin lapte. Nu se îmbolnăvesc persoanele cu un status imunologic normal.

Epidemiologie. În prezent, cea mai mare endemie tuberculoasă din Europa este în România : se înregistrează anual aprox. 162 cazuri/ 100.000 locuitori, comparativ cu 200 cazuri (emigranți) în total în Suedia. Există un program național de combatere a T.B.C., în colaborare cu O.M.S. Grupele de risc sunt considerate a fi: sugarii și tinerii între 15 – 30 de ani (puberi, elevi, studenți).

Factori de risc interni: sexul - boala este mai frecventă la bărbați, comparativ cu femeile (de 2 - 4x); vârsta 0 - 4 ani - receptivitate mare, datorită imaturității sistemului imunitar, 5 - 12 ani - rezistență mare, 12 - 18 ani receptivitate mare, 20 - 25 - risc mare = vârsta fiziogenă (la această vârstă se fac opțiuni majore: profesie, căsătorie, familie); boala ulcerată, psihopatie, alcoolism, SIDA (la acești pacienți - frecvente infecții oportuniste și cu *M. avium-intracellulare*).

Factori externi: statutul socio-economic care determină alimentația, calitatea locuinței, educația (raport O.M.S.- 98% din decese se înregistrează în țările în curs de dezvoltare; O.M.S. consideră că situația globală este scandaluoasă - 1,7 miliarde de oameni infectați).

Factori psihosociali: traume psihice, stări conflictuale prelungite, stres; factori profesionali - rol limitat; migrări de populație; tabagismul - este implicat mai mult în etiologia cancerului pulmonar.

Alte specii implicate în patologia umană

Mycobacterium leprae (bacilul lui Hansen) este agentul patogen al leprei, boală strict umană. Agentul patogen nu a putut fi cultivat *in vitro*. După contaminarea pe cale cutanată, perioada de incubare poate dura luni și ani de zile. Primele semne de boală sunt insidioase și se manifestă prin leziuni la nivelul pielii și mucoaselor și semne neurologice. Boala are o evoluție lentă, cu deformări și mutilări, spre *exitus*, care se produce prin cazexie. Leziunea tipică este

lepromul, un granulom bogat vascularizat, infiltrat cu macrofage care au fagocitat numerosi bacili.

Micobacterii netuberculoase (paratuberculoase sau atipice). Sunt specii saprotrofe, foarte răspândite în sol, gunoi de grajd, ape uzate, unele alimente (lapte, legume), comensale la om și animale, prezente pe tegumente și mucoase, în anumite condiții își pot manifesta potențialul patogen, comportându-se ca germeni conditionat – patogeni sau oportuniști. De exemplu, speciile de micobacterii prezente în microbiota bucală, la indivizii cu capacitate de apărare scăzută din diferite cauze, pot determina infecții ale tractului respirator numite micobacterioze benigne, cu diferite localizări: bronhopulmonare, ganglionare, cutanate, care pot evolua spre ulceratii și abcese. Mai puțin frecvente sunt localizarile meningeale, osoase, oculare, genitale.

Ex. *Mycobacterium kansasii* (infecții pulmonare, asemănătoare tuberculozei - *tuberculosis-like*).

M. ulcerans (specie prezentă în apa piscinelor), *M. fortuitum* (izolat din abcese determinate de injectii cu ace nesterile, ca și ale plagilor post chirurgicale), *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum* (determină scrofularioza, o adenită cervicală).

Diagnosticul de laborator.

Recoltarea produsului patologic - sputa purulentă:

– **examen direct**- pe frotiuri colorate prin metoda Ziehl-Nielsen (este necesar deoarece pot fi prezenti bacili morți, datorită chemoterapicelor, astfel ca la cultivare, examenul poate fi fals negativ)- micobacteriile apar ca bacili colorați în roșu (acidoalcoolorezistenți -AAR), scurți, subțiri și adesea grupați “în coardă” sau “în mustată” (datorită cord-factorului, pe fondul albastru al preparatului (în care se pot observa alte bacterii neacidoalcoolorezistente, leucocite PMN, fibrile de fibrină)

- **cultura** – metodologie standard, adoptată și în țara noastră - prin centrifugare; microbiota cavității bucale 10^8 bacterii ; sputa se tratează cu o soluție de Na OH, pentru distrugerea bacteriilor saprotrofe. B.K. este rezistent; apoi sputa se neutralizează, se centrifughează și din sediment se fac frotiuri și însămânțări pe mediul Loewenstein-Jensen (cu galbenus de ou). Creștere lentă: 15-20-60 zile. Examenul va fi pozitiv, dacă în produsul inițial a fost o densitate de 10^5 celule/ml sputa (la pacienți cu leziuni mari). Prin concentrare (centrifugare) sensibilitatea testului crește de 10 ori (leziuni mici). *Nocardia*, prezentă în tartrul dentar, poate fi prezentă și în lichidul pleural. Incubare de lungă durată: 6 – 8 săptămâni, făcând observații periodice;

- examenul caracterelor de cultură și de colonie: coloniile de *Mycobacterium tuberculosis* sunt nepigmentate, conopidiforme, rugoase (“R”);

- test imunologic *in vivo* I.D.R. la tuberculina (P.P.D.- *purified protein derivative of Seibert*); toate persoanele vaccinate in copilarie cu vaccinul antituberculos (B.C.G.) au o reactie slab pozitiva (o dovada a memoriei imunologice), dar cele bolnave de T.B.C. au o reactie intens pozitiva, indicata de o zona roseata si induratie, cu diametrul mai mare 15mm; reactia este de tip intarziat (exprimata in 48 de ore de la inocularea intradermica a tuberculinei), mediata celular.

Diagnosticul tuberculozei renale- urina concentrata (regim hiposodat, hipohidric, alimentatie exclusiv solida; bolnavul nu trebuie sa ia aspirina, paracetamol, vitamina C care inhiba BK) recoltata din doua zile, tratata cu NaOH, se injecteaza la cobai – cel mai sensibil la BK; daca exista cel putin un bacil, cobaiul se imbolnaveste; se urmareste 3 luni si apoi se sacrifica (se recolteaza organele interne: ganglioni, splina, ficat, rinichi, plamani; se fac observatii anatomopatologice si microscopice, apoi se tritureaza organele afectate si se reinoculeaza).

Metoda fluorescentei. Colorantii fluorescenti *auramina* si *rhodamina* pot fi utilizati pentru a demonstra prezenta bacililor AAR. Evidentiate prin aceasta metoda, celulele bacteriene apar galbene pe fondul intunecat, cand permanganatul de potasiu este folosit ca un colorant de contrast. Utilizarea acestei metode faciliteaza *screening*-ul frotiurilor, mai ales cand este folosit un obiectiv de 25x. Aceste obiective furnizeaza o marire suficient de mica pentru a vedea punctele luminoase galbene care emana din bacteriile care au fixat substantele fluorescente. Examinarea cu obiective mai mari poate confirma rezultatul pozitiv obtinut prin aceasta metoda.

Teste biochimice

- testul catalazei - micobacteriile fiind strict aerobe, sunt catalazo-pozitive;
- testul niacinei – este un test de “screening”: tulpinile de *M. tuberculosis* sunt niacino-pozitive, producand si acumuland in mediu acest metabolit, pe cand micobacteriile atipice sunt niacino-negative.
- Testul nitrat reductazei – reactie de culoare – *M. bovis* – reactie negativa; micobacteriile atipice – reactie pozitiva.
- Determinarea antibiotipului – micobacteriile atipice au o polichimiorezistenta nativa (la HIN, PAS, rifampicina); daca 1% din populatia bacteriana este rezistenta, este considerata in intregime rezistenta. Se fac dilutii pana la 10^{-3} ale culturilor, pentru a prinde mutantele rezistente.
- Sistemul automat de cultivare si detectie a micobacteriilor *M.B. BACT (BACTEC)* este un sistem bazat pe detectie radiometrica. Se utilizeaza un mediu de cultura lichid care contine acid palmitic cu ^{14}C . Micobacteriile preiau si metabolizeaza acest compus, devenind radioactive. Monitorizarea colorimetrica a cresterii bacteriene se bazeaza pe un dispozitiv

reflectometric care inregistreza la fiecare 10 minute. La densitatea de $10^6 - 10^7$ micobacterii/ml de mediu, apar semnale luminoase si sonore, care indica prezenta si pozitia in aparat (incubator special), in aprox. 2 saptamâni. Daca pâna acum o conditie a reusitei izolarii si cultivarii bacilului Koch din produsul patologic, era recoltarea acestuia inainte de inceperea tratamentului cu antibiotice, in prezent aceasta problema a fost depasita prin utilizarea unui mediu de cultura lichid cu adaos de carbune activ care absoarbe eventualele antibiotice din produsul inoculat .

- Identificare rapida : metode genetice (sonde de ADN).

* Deoarece **rezistenta la medicamente antituberculoase** (in special la HIN) este o problema in prezent, a fost imaginata recent o metoda moderna de detectare rapida (in câteva zile) a tulpinilor rezistente la izoniazida, care se bazeaza pe utilizarea *luciferazei* (enzima izolata de la licurici). Aceasta enzima emite lumina in prezenta ATP. Daca tulpina bacteriana izolata de la pacient este rezistenta, nu va fi afectata de agentul chemoterapeutic, va produce ATP si luciferaza adaugata in sistem va emite o lumina intensa ; daca bacteria este sensibila la HIN, cantitatea de ATP si implicit emisia de lumina vor fi mai reduse. Testul este foarte avantajos, având in vedere cresterea foarte lenta a bacilui Koch si timpul necesar pentru izolarea + testarea sensibilitatii agentului patogen , prea lung pentru ghidarea clinicianului in instituirea tratamentului.

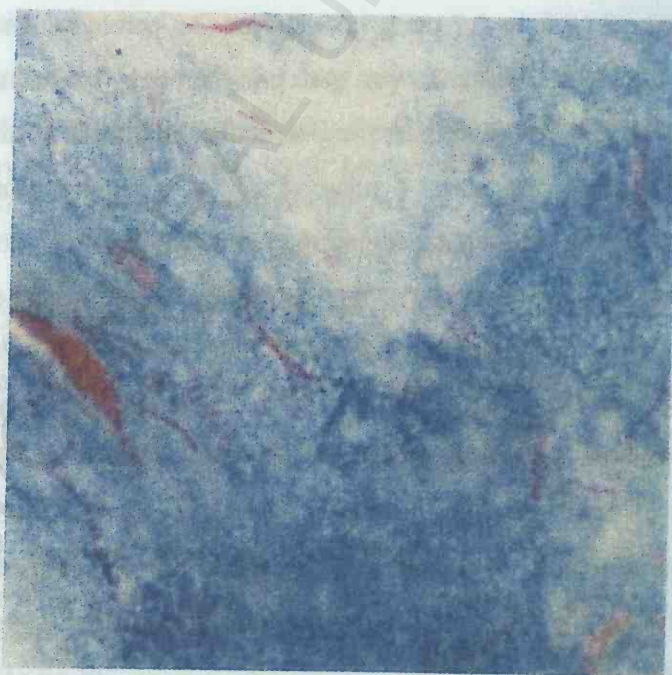


Fig. 41. Imagine la microscopul optic a unui frotiu colorat prin metoda Ziehl-Nielsen, efectuat din proba patologica (aspirat bronsic) in care se observa celule de de *Mycobacterium tuberculosis*; se observa bacili AAR colorati in rosu (pe fondul albastru al frotiului), izolati si grupati, incurbati, cu aspect granular, neregulat (marire: x 1000).

BACTERII PARAZITE OBLIGAT INTRACELULAR

Fam. *Rickettsiaceae*

Costituie un grup de bacterii parazite obligat intracelular, dintre care unele sunt patogene pentru om si animale. Considerate initial ca microorganisme intermediare intre bacterii si virusuri, rickettsiile apartin in mod evident lumii bacteriilor prin urmatoarele particularitati:

- organizarea celulara de tip procariot si structura diferitilor constitienti;
- compozitia chimica complexa si prezenta unor markeri biochimici pentru procariote;
- prezenta unei activitati metabolice proprii;
- multiplicarea prin diviziune;
- natura parazitismului – obligat intracelular, diferit de parazitismul absolut al virusurilor;
- sensibilitatea la antibiotice (tetraciclina si cloramfenicol).

Din punct de vedere filogenetic, rickettsiile au fost la origine paraziti naturali ai artropodelor, de la care au trecut la mamifere si ulterior la om, prin intermediul vectorilor hematofagi. Acest punct de vedere este justificat de faptul ce rickettsiile se mentin in natura trecând in mod obligatoriu prin organismul unui artropod (insecte, capuse sau alt acarian), la care de multe ori se transmite pe verticala.

Morfologie. Rickettsiile prezinta un pleomorfism accentuat, având forma de coci izolati sau in perechi, cocobacili, filamente subtiri si flexuoase. Forma tipica a celulelor este cea de bacili, cu dimensiuni cuprinse intre 0,3 - 0,7 μm x 1,5 - 2,0 μm . Au perete celular tipic structurat pentru bacteriile Gram negative, dar se coloreaza greu prin metodele uzuale. La exterior este prezent peretele celular, care contine acid muramic si acid diaminopimelic (markeri biochimici pentru procariote. Unele specii prezinta si o microcapsula cu proprietati antigenice. La interiorul peretelui celular se afla membrana citoplasmatica. Citoplasma contine structuri cu aspect granular (ribosomi) si vacuole. Cromosomul bacterian (nucleosomul) este alcatuit din ADN (200-400 gene), reprezentând aprox. 10-20% din ADN-ul *E.coli*. O serie de particularitati ale acizilor nucleici, pledeaza de asemenea pentru apartenenta la lumea bacteriana; astfel, procentul de perechi de baze G-C variaza intre 30 – 45%, iar raportul ARN/ADN = 3,5.

Metabolism. Desi au un echipament enzimatic redus, rickettsiile sunt capabile de activitate metabolica independenta, deoarece au in echipamentul lor enzimatic enzimele necesare atât pentru producerea de energie (enzimele ciclului Krebs, citocromi), independent de gazda, cât si pentru activitatea de biosinteza.

Membrana fiind foarte permeabila, da posibilitatea enzimelor NAD si CoA sa patrunda in celula rickettsiana. Aceasta permeabilitate excesiva ar explica imposibilitatea rickettsiilor de

a supraviețui în afara celulelor animale, deci **parazitismul lor obligat intracelular**, ca și **incapacitatea lor de a se dezvolta pe medii artificiale**. Se cultiva în laborator pe oua de găină embrionate, cu embrioni în vârstă de 6-7 zile sau pe culturi celulare.

Nu se cunosc mecanismele moleculare care le permit să crească și să se multiplice în fagolizozomi, care reprezintă în general un mediu nefavorabil pentru alte bacterii și nici cauzele parazitismului lor intracelular, în legătură cu care s-au emis mai multe ipoteze:

- permeabilitatea excesivă a membranei plasmatică, care în mediul extracelular s-ar manifesta unidirecțional (din interior spre exterior) ceea ce ar face imposibilă viața autonomă a celulelor bacteriene;
- deși au metabolism energetic, de îndată ce patrund în celulă ar deveni dependente de energia celei gazdă;
- ar avea o stare de auxotrofie neidentificată (incapacități de sinteză nedecelate încă, satisfăcute de celulele gazdă parazitare, care le oferă factorii de creștere necesari);
- rickettsiile ar fi microorganisme cu mecanisme de reglare foarte sensibile și de aceea s-au adaptat riguros la particularitățile mediului intracelular.

Multiplicarea rickettsiilor se realizează de regulă prin diviziune simplă, transversală, în citoplasma celulelor gazdă (vertebrate și artropode) și numai unele specii se multiplică în nucleul celulelor-gazdă.

Multiplicarea în laborator se practică prin mai multe modalități:

- cultivarea pe oua de găină embrionate în vârstă de 5-6 zile, metoda care asigură obținerea de masă celulară bacteriană în cantități mari, motiv pentru care această metodă se folosește pentru producerea antigenelor de diagnostic, a vaccinurilor, ca și în cercetarea acestor bacterii;
- cultivarea pe culturi de celule și țesuturi, mai ales în vederea studiului interrelațiilor celulă gazdă – parazit;
- cultivarea pe artropode (vectori naturali și rezervor de infecție); la acestea, rickettsiile sunt inofensive, dar transmise omului produc boli grave;
- inocularea la animale de laborator, practică cu scopul de a se face izolări primare, studii de infecțiozitate și imunogenitate.

Incadrare taxonomică. Poziția sistematică a acestui grup (după Bergey, 1986) este următoarea:

Ord. *Rickettsiales*,

Fam. *Rickettsiaceae*, cu următoarele genuri importante din punct de vedere medical:

1. Genul *Rickettsia* sp.

2. Genul *Coxiella* sp.

3. Genul *Rochalimaea* sp.

În prezent genului *Rochalimaea* i s-a schimbat denumirea și încadrarea (vezi Fam. *Bartonellaceae*)

Patogenia rickettsiilor

Rickettsiile produc boli la om si animale, numite generic *rickettsioze*, manifestate clinic prin eruptii cutanate (exantem), febra, cefalee, stare generala alterata, ca si prin leziuni proeminente in piele. Mecanismul de productie al acestora este urmatorul: rickettsiile se multiplica in celulele endoteliale ale capilarelor pielii si determina fenomene de hiperplazie, tomboza si necroza la acest nivel.

Reprezentanti:

Fam. *Rickettsiaceae*

1. *Rickettsia prowazekii* - agentul etiologic al tifosului exantematic, boala cu caracter epidemic. Acest agent patogen este sensibil la tetraciclina si cloramfenicol si se transmite prin vectori hematofagi (paduchii de cap sau de corp). Multiplicarea bacteriilor are loc in celulele intestinale ale insectei, eliminându-se odata cu excretele insectei pe pielea omului parazitat si patrundând in organismul acestuia prin leziunile de grataj. Bolnavul pastreaza pentru toata viata un numar mic de bacterii cantonate in ganglionii limfatici, splina. In perioada când organismul are o capacitate de aparare mai scazuta, bacteriile parasesc organele limfoide si se produce o infectie usoara, o recadere- denumita tifos de recadere. In aceasta perioada bolnavul este contagios, ca si in timpul infectiei initiale.

2. *Rickettsia rickettsii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca "febra muntilor Stâncosi", transmis prin capuse.

3. *Rickettsia conorii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca "febra butonoasa", transmis prin capusa de câine in Sud - Estul Europei (la noi ^Yintâra, mai ales in Dobrogea).

4. *Coxiella burnetii* - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca „tifos pulmonar” sau „febra Q” (de la numele provinciei Queensland din Australia, in care a aparut si a fost descrisa pentru prima data, ca si de la initiala termenului englez *query* = intrebare, termen care sugereaza faptul ca la data descrierii bolii, agentul patogen era necunoscut).

Initial, bacteria a fost studiata si inclusa de catre Cox in genul *Rickettsia* dar deosebirile au necesitat incadrarea ei intr-un gen aparte. Bacteria este mult mai mica, filtrabila prin filtrele bacteriologice, este sensibila la cloramfenicol si sulfamide. Are o rezistenta crescuta la actiunea agentilor fizici (caldura, radiatii) si chimici, pastrându-si viabilitatea la temperatura camerei pâna la un an, rezistenta care este mai mare decât a tuturor bacteriilor nesporigene cunoscute. Bacteria se multiplica extracelular si prezinta fenomenul variatiei de faza (I si II, cu

antigenitate diferita), fenomen similar cu cel al variatiei morfologice si antigenice a celorlalte bacterii, care formeaza colonii de tip S si de tip R.

Transmiterea acestui agent patogen se face prin intermediul capuselor (de ex. *Rhipicephalus*, in Oltenia), ale caror excrete ajung in aerosoli, patrundând apoi in corpul gazdelor, in special pe cale respiratorie, dar si digestiva si transcutanata. Desi tifosul pulmonar este o boala aparent mai putin grava, se pot produce adevarate explozii epidemice, in perioadele de transfer al turmelor. Sunt expusi si indivizii care lucreaza in industria carnii si a laptelui.

***Bartonella* sp.**

1. *Bartonella quintana* (denumirea initiala *Rickettsia quintana*, redenumita apoi *Rochalimaea quintana*) - agentul etiologic al bolii cunoscuta ca febra de transee, descrisa in primul razboi mondial (1917) si semnalata din nou in cel de al doilea si apoi in perioadele de mari concentrari umane (refugiati), situatii in care nu pot fi asigurate conditiile minime de igiena. Boala nu este mortala, dar are o evolutie lunga, de luni de zile, manifestându-se cu febra ondulanta, dureri de spate si membre. Agentul patogen este transmis de paduchele de corp, in intestinul caruia creste extracelular. Trecerea de la o gazda la alta, determina cresterea virulentei. Este un parazit facultativ intracelular, astfel ca se poate multiplica si pe medii acelulare (geloza-sânge) in atmosfera de CO₂. Incadrarea sa initiala intre rickettsii s-a facut exclusiv pe baza caracterelor epidemiologice, respectiv transmiterea prin vectori hematofagi. In prezent insa, pe baza rezultatelor metodelor moleculare, de amplificare genica si secventiere a moleculelor de ARNr 16S, denumirea si incadrarea taxonomica a genului *Rochalimaea* a fost schimbata in *Bartonella* (1993).

Aceasta specie poate fi si agentul cauzal al altor maladii umane, cum ar fi: angiomatoza bacilara (proliferarea vasculara cutanata sau subcutanata, cu posibilitatea extinderii la organele interne; semne vizibile: papule sau noduli friabili, hemoragici)-afectiune prezenta mai ales la indivizi cu imunodeficiente – de exemplu, la persoanele infectate cu virusul HIV), endocardita, adenopatii cronice.

2. *Bartonella henselae* – specie transmisa mai ales prin muscatura sau zgârietura pisicilor, dar si de catre de purici (*Ctenocephalides felis*). Rezervorul natural de infectie este pisica, majoritatea pisicilor fiind purtatoare asimptomatice. *Bartonella henselae* determina la om « maladia ghearelor de pisica » sau adenopatia febrila a copilului si a tinerilor imunocompetenti (fiind necesar diagnosticul diferential fata de alte adenopatii). Adenopatia

unica sau multipla se insoteste de febra si boala poate evolua cu complicatii: hepatosplenomegalie, dureri abdominale, atingeri nervoase si osoase. In forma fara complicatii, regresia adenopatiei este de obicei spontana, dar lenta (6-12 luni) si nu se recomanda tratamentul cu antibiotice. Agentul patogen este sensibil la ciprofloxacina si rifampicina. Aceasta specie mai poate determina si conjunctivita, angiomatoza bacilara, endocardita.

Diagnosticul de laborator al rickettsiozelor

- inocularea produselor patologice pe animale mici de laborator si pe oua embrionate si efectuarea de frotiuri din lichidele si tesuturile in care se multiplica bacteriile;
- diagnosticul bacteriologic (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (probe de sânge) si inocularea acestora la animale mici de laborator, pe oua embrionate sau pe culturi de celule. Dupa incubarea acestor substraturi celulare, se fac frotiuri care se coloreaza prin metoda speciala Gimenez. La examinarea acestora la microscopul optic cu obiectivul de imersie, se pot observa rickettsiile colorate in rosu stralucitor, pe fondul albastru al preparatului (celule embrionare);
- diagnosticul imunologic (indirect) se face prin teste *in vitro* : reactii de aglutinare pe lama (cu antigen rickettsian si ser de cercetat, reactia de paraaglutinare Weil-Felix – in tub, care utilizeaza cultura de *Proteus OX19*, tulpina care reactioneaza incrucisat cu anticorpii anti- *Rickettsia prowazekii* dintr-un ser de cercetat; reactia de fixare a complementului (RFC) cu antigen rickettsian si ser de cercetat; tehnica imunoenzimatica ELISA; metoda imunofluorescentei si teste *in vivo* : teste cutanate de hipersensibilitate la antigene rickettsiene ;
- metode genetice – pentru diagnosticarea infectiilor determinate mai ales de specia *Bartonella henselae*, specie cu crestere foarte lenta *in vitro* (15 – 40 zile). Metodele genetice sunt preferate (chiar daca necesita excizia unui ganglion) si datorita reactiilor imunologice incrucisate intre anticorpii anti- *Bartonella* si antigene ale speciilor *Coxiella burnetii*, *Chlamydia sp.*

Chlamydia sp.

Genul *Chlamydia* grupeaza trei specii importante pentru patologia umana: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*.

Chlamidiile sunt microorganisme procariote, parazite obligat intracelular, producând infectii si boli la om si animale.

Datorita faptului ca nu cresc pe medii artificiale au fost considerate virusuri mari, anvelopate (denumirea insasi a grupului deriva de la grecescul *chlamydos* care inseamna manta). Ulterior s-a demonstrat ca sunt bacterii, deoarece prezinta numeroase elemente structurale, compozitie chimica si caracteristici fiziologice bacteriene : organizare celulara de tip procariot, perete celular asemanator bacteriilor Gram negative, nucleoid alcatuit din aproximativ 600 gene (~ 25% din genomul bacteriei *E. coli*), prezenta celor 2 acizi nucleici - ADN si ARN, inmultire prin diviziune binara, metabolism propriu - rudimentar, sensibilitate la antibiotice. Pe langa faptul ca sunt parazite obligat intracelular (preluând din celula gazda aminoacizi, factori de crestere, nucleotide, NAD, CoA), parazitismul chlamidiilor prezinta o particularitate deosebita : sunt incapabile sa sintetizeze compusi macroergici, astfel ca utilizeaza ATP din celula gazda, fiind considerate si *parazite pentru energie*.

Cultivare. Fiind parazite obligat intracelular, chlamidiile se cultiva numai pe substraturi celulare, fie in sacul vitelin al oualor embrionate in vârsta de 6-7 zile la temperatura de 35°C, fie pe culturi de celule.

Ciclul de dezvoltare este specific, unic in lumea bacteriilor si se desfasoara astfel:

- *faza extracelulara*, foarte infectioasa, numita *corp elementar*, are forma cocoidala, cu dimensiuni de 0,2-1,5µm, care adera la membrana celulei gazda la nivelul unor receptori specifici (cu resturi de acid sialic), apoi prin endocitoza patrunde in celula gazda intr-un fagosome. Aici are loc o activare a corpurilor elementari, activare care implica modificari structurale si functionale (dispare peretele celular si de asemenea nucleoidul, genomul ADN trecând din faza nefunctionala, compacta, in faza functionala, de retea laxa, accesibila enzimelor de transcriere si replicare;

- *faza intracelulara*, neinfecioasa, reprezentata prin *corpul reticulat* (denumire datorata genomului care se prezinta sub forma unei retele fibrilare laxe, pregatita pentru multiplicare), forma vegetativa a chlamidiilor, cu dimensiuni de 1,0 - 1,6 µm, cu numerosi ribosomi 70S in citoplasma, care sintetizeaza metaboliți toxici care determina leziuni celulare. Corpuri reticulate sunt situate in vacuole citoplasmice unde se multiplica prin diviziuni binare repetate, prin fragmentare sau prin inmugurire, rezultând *corpi elementari progeneri (corpi de incluziune)*, care se elibereaza dupa maturare, prin ruperea membranei celulei gazda. Acestia infecteaza celulele sensibile invecinate, reluând ciclul si contribuind la propagarea infectiei (fig. 42).

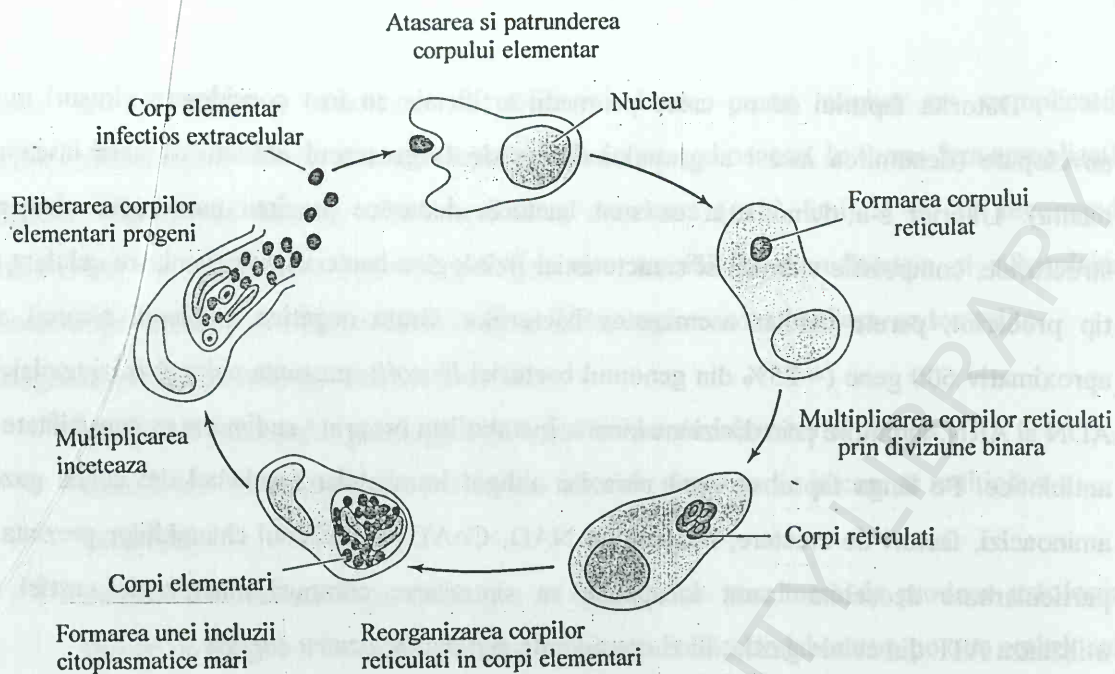


Fig. 42. Schema ciclului de viata al bacteriilor incadrate in *Chlamydia* sp.

Morfologie. Chlamidiile au forme cocoidale ($\varnothing = 0,2 - 1,5\mu\text{m}$), care se evidentiaza prin colorarea frotiurilor efectuate din sacul vitelin al oualor inoculate cu produse patologice, utilizând metode speciale de colorare (Gimenez, Machiavello, Giemsa). Pe frotiurile colorate prin metoda Gimenez, examinate la microscopul optic, cu obiectivul de imersie, se pot observa corpi de incluziune, colorati in rosu, pe fondul albastru al celulelor sacului vitelin.

Patogenie.

Chlamidiile au un spectru larg de gazde, infectând plante, insecte, vertebrate, inclusiv omul.

1. *C. trachomatis*, una din cele trei specii de chlamidii, este un parazit al speciei umane, fiind agentul patogen al unor infectii cu diferite localizari : oculara, orala, urogenitala. Infectia oculara determina boala denumita trachom, freventa in Orientul Mijlociu si in Africa, ca si conjunctivite neonatale si conjunctivita piscinelor. In cazul localizarii la nivelul aparatului genito-urinar, aceasta poate conduce la uretrite si limfogranulomatoza inghinala. *C. trachomatis*, este cunoscuta a fi unul din agentii etiologici majori ai infectiilor urogenitale asociate cu salpingita, sarcina ectopica si sterilitate la femei, ca si agent al uretritei negonococice si ai epididimitei la barbat. La femeie, localizarea cea mai frecventa a infectiei este la nivelul cervixului; infectia poate fi asimptomatica si daca nu este tratata, agentul patogen se deplaseaza ascendent spre uter, tropele utrine si ovare si poate determina o boala inflamatorie a pelvisului. Nou-nascutii mamelor infectate pot contracta conjunctivita, infectii nazofaringiene si pneumonii.

C. trachomatis de obicei se transmite prin contact personal apropiat (contact sexual sau în cursul nașterii). Indivizii cu infecții genitale asimptomatice constituie un important rezervor de infecție pentru alții. În trahom, agentul patogen se transmite prin contactul conjunctivei cu mâini murdare.

Bolile determinate de acest agent patogen sunt prezente în toată lumea, dar trahomul este mai frecvent în țările în curs de dezvoltare, în regiunile calde, secetoase. S-a observat că uretrita negonococică determinată de *C. trachomatis* este mai frecventă la indivizi cu un statut socioeconomic ridicat, spre deosebire de gonoree, care este predominantă la indivizi cu un statut socioeconomic scăzut. Totuși, cele două boli nu se exclud, putând fi prezente simultan la același individ.

2. *C. psittaci* este o specie frecventă mai ales la pasări, dar și la mamifere (inclusiv la om) și chiar la insecte. Datorită unui component al peretelui celular, aceste bacterii stimulează endocitarea de către celulele animale la membrana cărora aderă. Acest agent patogen produce infecții latente, inaparente la purtători, dar trecerea de la o gazdă la alta determină creșterea virulenței. Astfel, acest agent infecțios transmis de papagali și porumbei omului, mai ales pe cale aerogenă, prin inhalare de praf care conține excremente uscate de la pasări infectate, determină boli grave numite *psitacoze*. Ornitozele sunt boli transmise omului și animalelor, prin aerosoli, de către găini, rate, curci, care pot fi, de asemenea, purtătoare ale acestui agent patogen.

Psitacozele și ornitozele (care fac parte din categoria antropozoonozelor) se manifestă prin tuse, rinoree, dureri de cap, mialgii. La ovine, bovine, porcine acest agent patogen poate fi cauza unor enterite, poliartrite, placentite, pneumonii.

3. *Chlamydia pneumoniae* este o specie care a fost izolată pentru prima dată în 1965 în Taiwan. În 1986 această specie a fost recunoscută ca o cauză a infecțiilor respiratorii acute, fiind desemnată cu acronimul TWAR (Taiwan acute respiratory). În 1989 a fost desemnată ca o specie distinctă de celelalte două specii similare, patogene pentru om ale genului *Chlamydia*: *C. trachomatis* și *C. psittaci*. Specia *C. pneumoniae* poate exista în trei forme: corp elementar, corp reticulat și corp persistent. Corpul elementar este infecțios și poate invada celulele endoteliale și monocitele gazdei, după patrunderea pe cale respiratorie. După patrunderea în celulele gazdă prin endocitoză, corpul elementar se diferențiază în corp reticulat care se multiplică prin diviziune binară, în vacuole numite *corpi de incluziune*. Corpii reticulați, după diviziune, revin la stadiul de corpi elementari, care sunt eliberați prin liza

celulei gazda, initiind un alt ciclu de viata. Totusi, corpii elementari pot in mod imprevizibil sa evolueze intr-o forma metabolic inactiva numita *corp persistent*, care poate ramâne intr-un stadiu dormant perioade lungi de timp. Corpii persistenti nu sunt accesibili sistemului imunitar si substantelor antibiotice terapeutice.

C. pneumoniae infecteaza numai omul si se transmite de la persoana la persoana prin aerosoli. *C. pneumoniae* determina infectii cu o mare varietate de manifestari clinice – in special ale tractului respirator superior, in toata lumea. In tarile industrializate, poate fi cauza unor epidemii cu o periodicitate care variaza intre 4 – 7 ani, adultii de vârsta mijlocie fiind seropozitivi in proportie de 50 – 70 %.

In ultimii ani, anumiti autori afirma existenta unei legaturi intre inflamatiile de etiologie infectioasa si ateroscleroza. Anumiti agenti infectiosi specifici au fost identificati ca potentiali agenti cauzali ai inflamatiei si procesul de aterogeneza si aterotromboza, printre care: agenti virali (adenovirus, citomegalovirus, virusul coxsackie B, agenti bacterieni – streptococi, *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma fermentans*, *Coxiella burnetii*. Studii epidemiologice care au indicat o corelatie intre markeri ai infectiilor cu *C. pneumoniae* (anticorpi, complexe imune) si ateroscleroza, au fost publicate incepând cu anul 1988. Dovezi ale relatiei cauza – efect dintre infectiile cu *C. pneumoniae* si ateroscleroza au fost furnizate de investigatiile sero-epidemiologice, histopatologice, de studiile de patogenitate pe modele animale, de biologie moleculara si imunologie, ca si de cele privind influenta antibioticelor asupra acestei relatii.

Diagnosticul de laborator.

- diagnosticul bacteriologic (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (secretii ale mucoaselor infectate) si inocularea acestora pe oua embrionate sau pe culturi de celule. Dupa incubare, se fac frotiuri care se coloreaza prin metoda speciala Gimenez sau prin metoda Giemsa. Pe frotiurile colorate (metoda Gimenez, examinate la microscopul optic cu obiectivul de imersie, se pot observa corpi de incluziune intracitoplasmatici, colorati in rosu, pe fondul albastru al celulelor sacului vitelin ;
- diagnosticul imunologic (indirect) : prin metode imunoenzimatic **calitative** (de *screening*- lame de plastic cu antigen chlamidial adsorbit pe suport de hârtie de filtru, care se pune in contact cu o picatura de ser de bolnav; in cazul unui test pozitiv se produce o reactie de culoare, usor de citit si interpretat) si **cantitative tip ELISA**;
- metode genetice.

Diagnosticul infectiilor cu *C. trachomatis* prin **metode moleculare** (LCx *Chlamydia trachomatis* assay) se bazeaza pe reactia de amplificare LCR (*Ligase Chain Reaction*) pentru

detectarea directă, cantitativă a unei plasmide caracteristice acestei specii, prezente în probele de secreție vaginală sau uretrală, recoltate cu tamponul sau în probele de urină de la indivizi cu infecții simptomatice sau asimptomatice. Probele sunt tratate pentru ruperea peretilor celulari, separarea catenelor de ADN, prin încălzirea probelor în tamponul de transport al acestora.

Principiul metodei de amplificare LCR. Testul detectează o plasmidă criptică prezentă la toate serovarurile, în aprox. 10 copii/ corp elementar sau corp reticulat. Secvența de ADN țintă a acestei reacții este localizată pe această plasmidă și este înalt conservată la toate serovarurile de *C. trachomatis*, nu și la alte specii. Testul utilizează 4 probe de oligonucleotide, complementare secvenței țintă, pe care o recunosc și hibridizează cu aceasta, astfel ca secvențele oligonucleotidice vor fi adiacente, moment în care pot fi legate (reunite) enzimatic, rezultând un produs de amplificare. Acesta, servește ca țintă secundară pentru rundele ulterioare de amplificare, produsul acesteia fiind detectat cu ajutorul unui analizor *Abbot LCx*.

BACTERII CU PERETE CELULAR FLEXIBIL

Treponema pallidum

Treponema pallidum (= spirocheta palidă) este o bacterie spiralată, netoxigenă, înalt patogenă, care se răspândește prin contact interuman, sexual cel mai adesea, fiind agentul patogen al bolii numită sifilis sau lues. *T. pallidum* are o foarte largă distribuție; Organizația Mondială a Sănătății estimează că există 12 milioane de cazuri noi pe an de sifilis în toată lumea. Sifilisul rămâne o problemă, mai ales în țările în curs de dezvoltare, datorită sechelelor și riscului de infecții congenitale. Varietatea simptomelor clinice care însoțesc boala și similaritatea lor cu simptomele altor boli, au determinat medicii să supranumească sifilisul « marele imitator ».

Morfologie. Este o bacterie spiralată, cu dimensiuni care variază între 0,2 / 5 – 20 μm, mobilă; acest caracter – mobilitatea, este de tip particular, nemă întâlnit în lumea procariotelor. Deplasarea se realizează cu ajutorul unor filamente axiale (axostil), numărul acestora variind între 2 – 15/ celulă și care se rotesc în jurul cilindrului protoplastului helical (alcatuit din constituenți citoplasmatici și nucleari, membrana plasmatică și perete celular). Aceste structuri sunt învelite de o membrană subțire, semipermeabilă, numită *teacă externă* sau *invelisul celular extern*, alcatuită din proteine (60 – 70%), lipide (4 – 25%), glucide (1 – 27%). Prezența tecii face ca filamentele axiale, asemănătoare flagelilor ca structură și compoziție chimică, să fie structuri endocelulare, localizate între peretele celular și teacă externă.

Epidemiologie. *T. pallidum* intră în organism prin leziuni minime ale pielii sau mucoaselor (rani, leziuni sau pe la nivelul foliculilor pilosi), dar poate penetra și epiteliul intact.

al mucoaselor. Agentul patogen se poate transmite nu numai pe orizontala la alti indivizi, prin contact sexual, ci si vertical la fat, pe cale transplacentara.

Rezistenta agentului patogen in mediul extern. Transmiterea acestui agent patogen necesita contact direct persoana – persoana (in proportie de 90% se transmite prin contact sexual), datorita faptului ca aceasta bacterie nu supravietuieste in afara corpului si este foarte sensibila la oxigen (este microaerofila), uscaciune, caldura si dezinfectanti.

Patogenie. Bacteriile se multiplica foarte lent, timpul de generatie fiind de 33 de ore, astfel ca perioada medie de incubare dupa patrunderea agentului patogen in organism este de 3 saptamâni. Multiplicarea locala conduce la infiltrarea cu polimorfonucleare, macrofage si plasmocite si arterita consecutiva. Infectia cu *T. pallidum* evolueaza in 3 stadii: sifilis primar, secundar si tertiar. Totusi nu toti pacientii trec prin toate cele 3 stadii; o proportie substantiala ramâne permanent libera de boala dupa trecerea prin stadiul primar si secundar. Acest stadiu poate fi urmat de o perioada de latentă de 3 – 30 de ani, dupa care boala poate reveni, trecând in stadiul tertiar. Spre deosebire de alti agenti patogeni bacterieni, *T. pallidum* poate supravietui in organism pentru multi ani, in ciuda raspunsului imun prezent. S-a sugerat ca treponemele ramân neafectate de mecanismele de aparare ale organismului (de recunoastere si eliminare a ceea ce este strain) datorita suprafetei celulare bogate in lipide. Acest strat este inactiv din punct de vedere antigenic si antigenele sunt nemascate doar la bacteriile moarte, fata de care organismul este capabil sa raspunda imunologic. Leziunile tisulare se datoreaza mai ales reactiilor gazdei.

In ciuda multor ani de incercari, *T. pallidum* a ramas in continuare o bacterie necultivabila in laborator pe medii artificiale, ceea ce a facut dificil studiul posibiloilor factori de virulenta la nivel molecular, desi multe gene au fost clonate in *E. coli* si au fost caracterizate proteine majore.

In primul stadiu al bolii - **sifilis primar** este prezent sancrul sifilitic, o ulceratie circulara, rosie, nedureroasa, cu margini ridicate si tari, descrise ca având consistenta cartilajului, care apare la locul de intrare al spirochetelor, adesea reprezentat de mucoasa genituala. Dar orice zona a pielii poate fi afectata : faringe, rect, buze (cu secole in urma, desi nu stiau ce anume determina aceasta boala grava, oamenii au observat ca sifilisul se poate transmite prin sarut si atunci au inceput sa inlocuiasca sarutul pe buze, cu strangerea de mâna si sarutul pe obraz). In sancru se pot evidentia spirochete. Aceasta leziune persista 2 – 6 saptamâni, dupa care dispare spontan.

Sifilisul secundar se caracterizeaza prin febra si simptome specifice starii gripale (*influenza - like*), ca si prin tumefierea ganglionilor limfatici regionali. Roseata pielii care apare, poate fi confundata cu un semn al pojarului, rubeolei sau varicelei. Poate sa apara pierderea parului sprâncenelor si de pe cap (zone limitate). Suferinta hepatica se poate manifesta prin icter si astfel poate exista suspiciunea de hepatita. La pacientii netratati, simptomele pot dura câteva săptămâni, timp in care moartea poate sa survina. Majoritatea pacientilor isi revin, dar ramân cu cicatrici ale leziunilor. Acesti indivizi intra intr-un stadiu de latentă a bolii, in timpul careia ramân infectiosi.

Aproximativ o treime din pacientii netratati pot evolua spre **sifilisul tertiar**. Acest stadiu poate avea un tablou clinic diferit, dar cel mai adesea implica pielea, sistemul cardiovascular si sistemul nervos. Simptomul patognomonic al acestui stadiu sunt *gomele sifilitice*, leziuni moi, granulare. In sistemul cardiovascular, gomele slabesc rezistenta peretilor vaselor mari, care se umfla si pot exploda. In maduva spinarii si meninge, gomele conduc la degenerescenta tesutului (*tabes*) si eventual la paralizie. La nivelul encefalului, gomele pot altera personalitatea si ratiunea pacientului.

Sifilisul constituie o problema deosebita pentru femeia insarcinata, deoarece spirochetele sunt capabile sa traverseze bariera placentara si sa genereze **sifilisul congenital**, transmis de mama infectata, fatului *in utero*, ce poate fi dobândit dupa primele 3 – 4 luni de sarcina. Boala se poate manifesta ca:

- Infectie grava care poate conduce la moarte intrauterina;
- Anomalii congenitale care pot fi evidente la nastere (meningita);
- Infectie latentă, care poate ramâne inaparentă pâna aproape de vârsta de 2 ani , când se poate manifesta sub forma unor deformitati faciale sau ale dintilor.

Copiii afectati pot manifesta si asa-numita *triada Hutchinson* (descrisa pentru prima data la Londra – 1861, de catre J. Hutchinson), care este o combinatie de : surzenie, vedere slaba, dinti in forma de cui.

Pentru a putea controla sifilisul sunt foarte importante masurile de depistare a bolii si tratarea persoanelor bolnave, ca si a contactilor acesteia. Antibioticul de electie pentru sifilisul primar, secundar si stadiile latente ale bolii este penicilina, dar antibioticele sunt ineficiente in sifilisul tertiar, deoarece gomele constituie o manifestare a raspunsului imun fata de spirochete.

T. pallidum se multiplica foarte lent in tesuturi, ceea ce constituie un factor care contribuie la succesul antibioterapiei.

Diagnosticul de laborator al sifilisului

Agentul patogen neputând fi cultivat *in vitro*, diagnosticul de laborator se face prin microscopie directa si serologie. In stadiul primar, diagnosticul se poate face prin observarea

spirochetelor din sâncru, la un microscop cu fond întunecat sau prin efectuarea de preparate colorate prin metoda impregnării argentice (Fontana – Tribondeau) (fig. 43). Pe măsura evoluției bolii, se pot efectua o serie de teste serologice, de evidențiere a prezentei anticorpilor, cum ar fi :

- testul rapid de evidențiere a reaginei plasmatice ;
- testul de floculare (aglutinare) tip VDRL (*venereal disease research laboratory*);
- testul de imunofluorescență indirectă , utilizând lame pe care s-au fixat antigene treponemice;
- reacția de fixare a complementului (R.F.C.), tip R.B.W. (reacția Bordet-Wassermann), care se utilizează în diferite variante metodologice, macro- și micrometoda, la cald și la rece, calitativă și cantitativă, cu antigen nespecific (cardiolipinic) care reacționează încrucișat cu anticorpii anti-treponemici.

De asemenea, sunt disponibile și o serie de teste specifice, care utilizează antigene treponemice (cu Ag de grup strict specifice, extrase din celulele speciei *Treponema pallidum*, tulpinile Nichols sau Reuter), folosite pentru confirmarea testelor de triaj (*screening*) al populației.

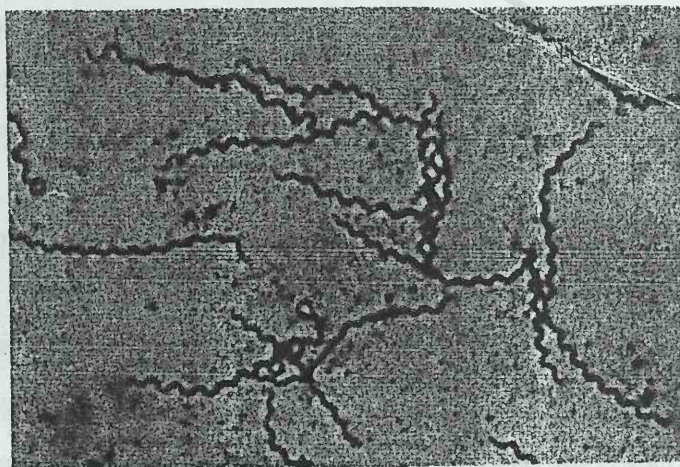


Fig. 43. *Treponema pallidum*. Imagine microscopica a spirochetelor, evidențiate pe un preparat colorat prin metoda Fontana – Tribondeau (mărire : x 1000).

BACTERII FARA PERETE CELULAR

Mycoplasma sp.

Micoplasmele sunt bacterii mici, lipsite de perete celular, delimitate de o membrană lipoproteică, cu o compoziție chimică asemănătoare celulelor animale. Sunt cele mai mici și mai primitive microorganisme capabile să crească autonom pe mediu acelular. Au fost descrise și denumite inițial cu acronimul PPLO = *pleuropneumonia like-organisms* (= organisme asemănătoare cu agenții patogeni ai pleuropneumoniei bovinelor, numiți pe scurt PPO = *pleuropneumonia organisms*). Au izolat și cultivate pentru prima dată în 1890, de către Nocard și Roux.

Incadrare taxonomică. Aceste microorganisme sunt încadrate în:

Diviz. a III-a. *Tenericutes* (lat. *teneri* = tandru, moale; *cutes* = piele)

Clasa *Mollicutes* (lat. *molli* = moale, pliabil);

Fam. *Mycoplasmataceae*

- genuri reprezentative pentru patologia umană:

Mycoplasma sp.

Ureaplasma sp. (cu o specie izolată din probele clinice *U. urealyticum*).

Morfologie. Datorită lipsei peretelui celular au o plasticitate naturală foarte mare, tradusă prin polimorfism celular, prezentându-se sub forme cocoidale sau filamentoase (*M. hominis*, *M. pneumoniae*). Deși nu au perete celular (cu rol esențial în determinarea proprietăților tinctoriale), sunt considerate bacterii Gram negative, cu dimensiuni care variază între 150 - 1000 nm (cele mai mici având dimensiuni cuprinse între 125 - 150 nm), ceea ce le conferă capacitatea de a traversa filtrele de membrană care rețin bacteriile cu perete celular ($\varnothing$ porilor = 450 nm).

Mobilitate. Există atât specii mobile, cât și specii imobile. Mobilitatea se realizează prin mișcări de alunecare pe suprafețe acoperite de lichide.

Ultrastructura. Examinarea electronomicroscopică evidențiază o organizare simplă, existând totuși structurile esențiale pentru creștere și multiplicare.

Componente celulare:

- membrana plasmatică delimitează citoplasma și este de natură lipoproteică (aproximativ 25% din lipide fiind reprezentate de colesterol);
- materialul nuclear este reprezentat printr-o moleculă de ADN, care constituie cel mai mic genom din lumea microorganismelor (fiind echivalent cu 1/6 din cromosomul bacteriei *E. coli*) și care conține cantitatea de informație minimă necesară pentru reproducerea autonomă. Conținutul în (G+C) al ADN este extrem de scăzut, explicând necesitățile lor complexe nutriționale și modul de viață parazitar.
- ribosomi 70S, care conferă sensibilitate la antibiotice care inhibă proteosinteza: tetraciclină, eritromicină s.a.;

* lipsa peretelui celular le conferă marea plasticitate morfologică, capacitatea de a traversa filtrele bacteriologice, rezistența la antibioticele care inhibă sinteza peretelui celular, sensibilitatea la presiune osmotică mare, tendința de creștere și pătrundere în profunzimea

mediului de cultura, incapacitatea de a se colora cu coloranti utilizati in mod obisnuit in bacteriologie, imposibilitatea de a fi observate la microscopul optic.

Multiplicare. Studii cinematografice (1973) au relevat faptul ca la aceeasi specie multiplicarea se poate face prin diviziune binara, inmugurire, fragmentarea filamentelor, rezultând elemente cocoide.

Metabolism. Micoplasmele sunt bacterii cu capacitati biosintetice limitate, care reflecta dimensiunile mici ale genomului si explica modul de viata parazitar (cu exceptia speciilor saprotofe). Din acest motiv, necesita medii de cultura complexe care contin infuzie de extract de cord bovin (aport proteic), peptone, extract de drojdie (aport de vitamine din grupul B si acizi nucleici), ser sanguin (aport de colesterol si acizi grasi), glucoza (pentru cele cu proprietati fermentative), arginina (pentru cele nefermentative), un sistem tampon, antibiotice (inhiba cresterea celorlalte bacterii si a microfungilor).

Caractere de cultura. Micoplasmele au o crestere lenta, astfel ca mediile insamântate necesita o perioada de incubare de ~ 15 zile. Pe mediu solid dezvoltă colonii incrustate in geloza (datorita lipsei peretelui celular, bacteriile au tendinta de a patrunde in mediul de cultura, pentru a evita deshidratarea), cu aspect caracteristic de "ou ochi" (engl. *fried egg*), cu diametrul de 0,5 mm (fig. 44). In culturile de micoplasme dezvoltate pe mediu lichid se observa unde matasoase, filamente fragile sau mediul poate fi tulbure uniform.

Patogenitate. Micoplasmele sunt frecvent parazite ale omului si animalelor, infectia fiind favorizata de natura chimica a membranei plasmactice, care este similara cu cea a membranei celulei animale si astfel micoplasmele nu sunt recunoscute ca straine (*non - self*), fiind tolerate de catre sistemul imunitar al gazdei. Bacteriile adera la suprafata celulelor parazitare, la nivelul unor receptori specifici, fiind considerate paraziti de suprafata si se multiplica utilizând substantele adsorbite de membrana celulara. Acest aspect este important pentru patogenia lor, deoarece se realizeaza astfel o concentratie locala de metaboliți toxici (enzime hidrolazice-proteaze, lipaze), care degradeaza membrana celulei gazda. De asemenea, produc si elimina in mediu neuraminidaza (sialoglicopeptidaza), cu efect de modificare a incarcaturii electrice de suprafata a membranelor, de modificare a aderenței normale între celule si a inhibiției de contact.

Micoplasmele produc infectii ale cailor respiratorii si urogenitale. La om, anumite specii de micoplasme fac parte din microbiota normala a mucoaselor bucala (*M. orale*, *M. buccale*, *M. lipophilum*, *M. salivarium* - aceasta ultima specie are un rol, controversat, in

boala periodontala) si genitla (*M. genitalium*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. penetrans*), iar altele sunt patogene.

Astfel, specia *M. pneumoniae* este recunoscuta unanim ca agent cauzal al pneumoniei atipice (o boala cronica), in sensul ca acest tip de pneumonie este cauzata de alt agent etiologic, decât cei bine cunoscuti in prezent a determina pneumonia, cum ar fi : agenti virali (virusul gripal, virusul respirator sincitial, adenovirusurile), bacterieni (*Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*), fungici (*Pneumocystis carinii*- microorganism considerat inainte protozoar si reincadrat taxonomic, pe baza analizelor genetice – vezi Cap. de Fungi patogeni). *M. pneumoniae* se transmite pe cale aerogena, prin intermediul picaturilor Pflugge, dar numai 3 - 10 % dintre cei contaminati se imbolnăvesc de pneumonie atipica. Aproximativ o cincime dintre cei contaminati ramân purtatori sau manifesta simptome usoare de faringita, traheobronșita.

Specia *M. hominis* este agentul cauzal al unor uretrite, vaginite, cervicite si infectii neonatale. De asemenea, micoplasmele care determina infectii ale tractului genital pot fi responsabile de sterilitate la barbati si femei (in cazul infectiilor netratate), deoarece se cantoneaza in gâtul spermatozoidului (afectând mobilitatea acestuia) sau in ovul (care este sensibil la neuraminidaza).

Speciile *M. fermentans* si *M. penetrans* sunt agenti oportunisti izolati frecvent de la indivizii infectati cu virusul HIV.

Specia *Ureaplasma urealyticum* poate fi agentul cauzal al uretritei negonococice, al unor infectii ale tractului genital superior, ca si al unor infectii neonatale (infectii ale tractului respirator). Aceasta specie, ca si *M. hominis*, poate fi cauza unor infectii ale lichidului amniotic, ale avortului spontan, al mortii fatului, ca si al febrei *post-partum*.

Cercetari mai noi au aratat ca, datorita contactului intim intre membrana plasmatica a micoplasmelor cu cea a celulei gazda, se produce un schimb de antigene intre cele doua membrane, astfel ca antigene proprii organismului gazda, trecând pe membrana micoplasmelor, nu mai sunt recunoscute ca fiind proprii (*self*) si devin imunogene, determinând sinteza de autoanticorpi.

Micoplasmele sunt frecvent prezente in culturile de celule utilizate in virologie si in alte scopuri, in care produc modificari cromozomale care conduc la transformarea maligna.

Diagnosticul de laborator

- **diagnostic bacteriologic** (direct) - se bazeaza pe recoltarea de produse patologice (secretii ale mucoaselor infectate) si inocularea acestora pe medii de cultura solide si lichide. Dupa incubare, se examineaza caracterele de cultura. Pe medii solide examinate la microscopul optic cu un obiectiv uscat, se pot observa coloniile specifice, incrustate in geloza (in forma de «ou ochi»), care se pot colora. Metoda este utila identificarii speciei *M. hominis*, care formeaza colonii de ~ 300 nm in diametru, in aprox. 5 zile (are o crestere mai rapida) (fig. 44);
- teste biochimice: se utilizeaza medii speciale cu glucoza (pentru specia *M. fermentans*), arginina (pentru identificarea speciei *M. hominis*), cu uree (pentru identificarea speciei *U. urealyticum*) si adaos de rosu fenol ca indicator ;
- testul de hemadsorbtie (hematii de cobai) si testul reducerii unei sari de tetrazoliu (reducerea sarii incolore *triphenyl tetrazolium* la formazan de culoare rosie) sunt teste utile identificarii speciei *M. pneumoniae* ;
- sisteme microtest de identificare: Mycotrim RS (pentru identificarea *M. pneumoniae*) si Mycotrim Triphasic flask (pentru identificarea micoplasmelor specifice cailor genitale) ;
- **diagnosticul imunologic** (indirect) : prin metode imunoenzimactice calitative (de *screening*) si cantitative (tip ELISA);
- **metode genetice** (PCR) .

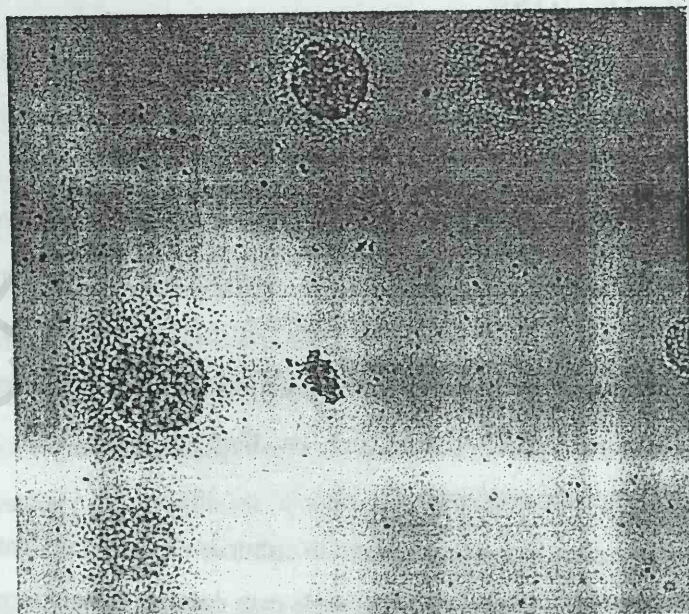


Fig. 44. *Mycoplasma hominis* in cultura: colonii cu aspect tipic de "ou-ochi" (marire: x 100).

Substanțe antibiotice. Fenomenul de rezistență și multirezistență la antibiotice

Antibioticele au fost considerate ca fiind cel mai important agent terapeutic descoperit în istoria medicinei, pentru că au revoluționat net capacitatea clinicienilor de a ține în frâu moartea și boala cauzate de microorganismele patogene, ceea ce s-a întâmplat într-un timp relativ scurt, mai exact în aproximativ o jumătate de secol, producția industrială a primului antibiotic descoperit (penicilina – Fleming, 1928) și utilizarea sa în terapie pe scară largă, începând din 1943.

Capacitatea antibioticelor de a realiza vindecări rapide ale unor infecții care erau înainte fatale, a condus la considerarea lor ca „medicamente miraculoase”. Considerarea aceasta este valabilă și în prezent și chiar dacă dintr-un anumit punct de vedere antibioticele și-au meritat renumele, acesta în mod paradoxal a creat și o anumită breșă în „armura” lor. Miracolele atribuite acestor medicamente, au condus la utilizarea lor incorectă și mai ales la o suprautilizare. Astfel, antibioticele au selectat tulpinile care aveau determinanți genetici de rezistență la antibiotice și capacitatea naturală de a rezista la acțiunea antibioticelor. Multi dintre acești factori de rezistență pot fi transferați și răspândiți de la un tip de bacterii rezistente, la alte bacterii, chiar aparținând la genuri și specii diferite. Acest rezultat negativ al utilizării antibioticelor, un fenomen considerat un adevărat paradox, nu înseamnă că antibioticele au decăzut sau că nu mai pot fi utilizate, ci reflectă doar natura duală a efectelor puternice pe care le au și necesitatea utilizării lor cu prudență.

Antibioticele rămân în continuare foarte eficiente în tratarea majorității bolilor infecțioase bacteriene. Situația este nesigură totuși și în continuă schimbare. Astfel, în multe părți ale lumii costul mic al antibioticelor din prima generație și suprautilizarea lor fac ca acestea să nu mai fie eficiente, datorită rezistenței pe care bacteriile au dobândit-o față de acestea. Antibioticele de ultimă generație aparute pentru a combate bacteriile rezistente, sunt prea scumpe pentru a fi accesibile acestor țări în curs de dezvoltare, astfel că antibioticele vechi continuă să fie utilizate în ciuda creșterii frecvenței tulpinilor rezistente față de acestea, ceea ce are ca efect propagarea fenomenului de rezistență. În anumite regiuni, antibioticele sunt foarte puțin utilizate datorită lipsei disponibilităților. Se poate spune deci că utilizarea antibioticelor necesită îmbunătățiri în toate părțile lumii.

Antibioticele sunt încă medicamente foarte valoroase, o prețioasă resursă naturală, numai că ar trebui mai bine înțelese unde și când sunt folositoare. Pe de altă parte, antibioticele au

diferite utilizari care ar trebui schimbate si reduse. O imbunatatire a utilizării antibioticelor trebuie sa priveasca pe toti cei care utilizeaza aceste medicamente si anume, pe consumatori, pe cei care prescriu antibiotice (medici umani si veterinari, fitopatologi) ca si pe producatorii si distribuitorii lor. Prin recunoasterea diferitelor domenii in care utilizarea antibioticelor poate fi imbunatatita, se spera stimularea unei mai bune distributii si aplicari si o reducere a amenintarii reprezentate de fenomenul de rezistenta.

Rezistenta la antibiotice poate fi determinata, de actiunea unor determinanti genetici cromozomali, de segmente de ADN excedentare (transpozoni), integrate prin recombinare genetica. In majoritatea cazurilor insa, fenomenul este conditionat de prezenta plasmidelor R, de rezistenta si multirezistenta la antibiotice.

Bazele genetice ale rezistentei.

A. Rezistenta mediata cromozomal este datorata unei mutatii a genei care codifica fie tinta antibioticului, fie sistemul de transport la nivelul membranei, care controleaza patrunderea antibioticului. Frecventa mutatiilor spontane este de ordinul $10^{-7} - 10^{-9}$, care este mult mai scazuta, comparativ cu frecventa dobândirii plasmidelor de rezistenta.

B. Rezistenta mediata de plasmide.

Plasmidele R sunt importante din punct de vedere clinic, din urmatoarele considerente:

- Sunt prezente la numeroase specii, dar mai ales la bacilii Gram - negativi.
- Determina adesea rezistenta multipla la antibiotice.
- Plasmidele au o mare rata de transfer de la o celula la alta, de obicei prin conjugare, fara bariere de gen si specie.

Mecanismele rezistentei la antibiotice. Exista patru mecanisme majore care mediaza rezistenta bacteriana la antibiotice (tabelul nr. 9): 1) Producerea de enzime care inactiveaza antibioticul; exemple: β -lactamazele inactiveaza penicilinele si cefalosporinele prin clivarea inelului β -lactam din structura acestor antibiotice; 2) Sinteza de catre bacterii a unor tinte modificate, asupra carora antibioticul nu are efect; exemple: o proteina ribozomala din subunitatea 30S determina rezistenta la streptomicina, iar ARNr 23 S metilat determina rezistenta la eritromicina. 3) Scaderea permeabilitatii membranei bacteriene, astfel ca o concentratie intracelulara eficienta a antibioticului nu mai poate fi atinsa; exemple: modificari ale porinelor pot reduce cantitatea de penicilina care patrunde in celula. 4) Eliminarea antibioticului de catre bacteria rezistenta cu ajutorul unei pompe "multidrug resistance", care importa protoni si elimina diverse molecule straine, cum ar fi antibioticele din familia quinolonelor.

Tabel nr. 9. Mecanismul de actiune al celor mai importante antibiotice antibacteriene si antifungice.

Mecanism de actiune	Antibiotice
Inhibarea sintezei peretelui celular Inhibarea formarii legaturilor incrucisate interpeptidice din structura peptidoglicanului	Peniciline (G, ampicilina), cefalosporine, imipenem, aztreonam, vancomicina
Inhibarea altor etape ale sintezei peptidoglicanului	Cicloserina, bacitracina
Inhibarea proteosintezei Actiune asupra subunitatii ribozomale 50S	Cloramfenicol, eritromicina, clindamicina
Actiune asupra subunitatii ribozomale 30S	Tetraciclina si aminoglicozide (streptomicina, gentamicina, tobramicina, neomicina)
Inhibarea sintezei acizilor nucleici Inhibarea sintezei nucleotidelor	Sulfonamide, trimetoprim (biseptol)
Inhibarea sintezei ADN	Quinolone (ciprofloxacin, norfloxacin, acid nalidixic)
Inhibarea sintezei ARNm	Rifampin
Alterarea functiilor membranei celulare Activitate antibacteriana	Polimixine (colistin)
Activitate antifungica	Amfotericina B, nistatin, fluconazol, ketoconazol, Miconazol, clotrimazol
Alte mecanisme de actiune Diferite mecanisme	Izoniazida, metronidazol, griseofulvin, pentamidina

Rezistenta la antibiotice poate fi determinata si de schimbari care nu sunt la nivel genetic, care se pot datora:

- ❖ infectiilor strict localizate, cu bacterii prezente in colectii purulente delimitate de fibrina, la nivelul carora antibioticele nu pot patrunde, fiind absolut necesara interventia chirurgicala;
- ❖ starii de latentă a bacteriilor care nu cresc si astfel sunt insensibile la antibioticele inhibitorii ale sintezei peretelui celular, cum ar fi penicilinele si cefalosporinele; in mod similar, *M. tuberculosis* poate ramâne in stare dormanta in tesuturi pentru multi ani, timp in care nu este sensibil la antibiotice, dar poate intra din nou intr-un ciclu activ de multiplicare când apararea organismului gazda este deficitara, bacteriile fiind din nou sensibile la antibiotice, ceea ce dovedeste ca nu s-a produs nici o schimbare la nivel genetic;
- ❖ pierderii peretelui celular de catre bacteriile care in mod normal sunt sensibile la penicilina, care pot supravietui ca protoplasti, insensibili la antibioticele active pe peretele celular (daca bacteriile isi resintetizeaza peretele, redevin sensibile la penicilina);

- ❖ aderenței bacteriilor la un substrat celular sau inert (biomateriale utilizate în medicina) generând un biofilm în care celulele bacteriene manifesta un comportament diferit comparativ cu celulele libere în suspensie (datorită modificării exprimării genelor), între care și o *rezistență fenotipică* la antibiotice;
- ❖ aparentei de rezistență a bacteriilor (în infecții tratate cu doze insuficiente de antibiotice sau cu antibiotice care nu pot ajunge la focarul de infecție pentru că, de ex., nu pot penetra bariera hematoencefalică).

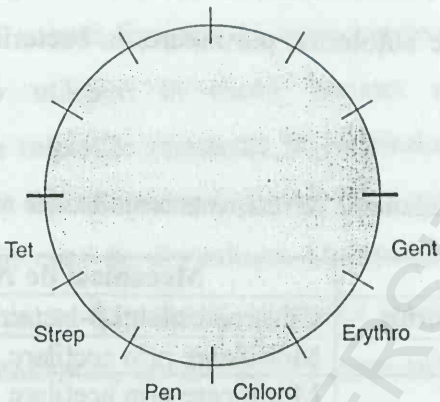
Plasmidele R (de rezistență infecțioasă la antibiotice), descrise inițial de Watanabe (1952), sunt elemente genetice extracromozomale, care conferă celulei purtătoare rezistență simultană la mai multe antibiotice, sulfamide etc. Factorii de rezistență (plasmidele R) sunt molecule de ADN extracromozomal, dublu helical, circular, care poartă gene pentru o varietate de enzime care pot degrada antibiotice și pot modifica sistemele de transport transmembranar. În unele cazuri, numărul antibioticelor devenite ineficiente față de o anumită bacterie este foarte mare, putând cuprinde antibioticele din clasa β -lactaminelor (peniciline și cefalosporine, naturale și semisintetice), din grupul aminazidelor (streptomicină, kanamicină, neomicină, gentamicină etc.), tetraciclina, cloramfenicol și derivați ai acestuia, precum și sulfamide. O bacterie patogenă care poartă o plasmidă capabilă să confere rezistență multiplă la antibiotice prin mecanisme specifice, este foarte greu de combătut prin mijloace terapeutice tradiționale.

Plasmidele R au o structură genetică complexă, fiind alcătuite din două regiuni funcționale, genetic distincte: 1) genele care asigură proprietatea de rezistență la antibiotice (notate „r”, sau „det-r”) și 2) genele care conferă funcția de conjugon sau transferon, formând așa-numitul factor de transfer al rezistenței („FTR”), ce asigură capacitatea de replicare autonomă și de transfer sexual prin conjugare (fig. 45). O celulă bacteriană poate purta mai multe gene de rezistență, ceea ce-i poate conferi caracterul de multirezistență sau super-rezistență și chiar de rezistență la toate antibioticele utilizate în mod curent. Genele de rezistență la antibiotice de pe plasmidele R, pot fi considerate gene de virulență, deoarece dobândirea rezistenței la agenți antibacterieni determină creșterea incidenței și răspândirea continuă a infecțiilor bacteriene.

Plasmidele R au fost evidențiate la membrii multor familii, genuri și specii (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Yersinia sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.* etc.) (tabel nr. 10), dar mult studiate în special la bacteriile intestinale, la care frecvența lor printre tulpinile izolate din anumite colectivități este foarte mare, mai ales după folosirea antibioticelor în

terapeutica. Colonizarea intestinala cu tulpini rezistente de enterobacterii, poate avea loc si in absenta tratamentului cu antibiotice, ceea ce sugereaza ca tulpinile rezistente la antibiotice care au fost mult timp utilizate, pot deveni constituinti ai microbiotei intestinale normale a comunitatii, dobândite de catre aceasta din surse din mediu, inclusiv hrana.

Gene de transfer al rezistentei (operonul “tra”)



Gene de rezistenta la antibiotice

Fig. 45. Plasmid R - de rezistenta . Majoritatea plasmidelor de rezistenta au doua seturi de gene: 1) gene de transfer ala rezistentei care codifica pilii de sex si alte proteine care mediaza transferul plasmidelor prin conjugare si 2) gene de rezistenta la antibiotice care codifica proteine care determina rezistenta la antibiotice. Jumatatea din partea de jos a figurii ilustreaza, de la dreapta la stânga, genele care codifica rezistenta la tetraciclina, streptomicina, penicilina, cloramfenicol, eritromicina si gentamicina.

Tabel nr. 10. Bacteriile care prezinta fenomenul de rezistenta la antibiotice.

Tipul de bacterii	Rezistenta la antibiotice semnificativa clin
Coci Gram pozitivi <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Penicilina G, nafcilin Penicilina G Penicilina G, aminoglicozide, vancomicina
Coci Gram negativi <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Penicilina G
Bacili Gram pozitivi -	
Bacili Gram negativi <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i>	Ampicilina Antibiotice β -lactamice, aminoglicozide Antibiotice β -lactamice, aminoglicozide
Mycobacterii <i>M. tuberculosis</i> <i>M. avium- intracellulare</i>	Izoniazid, rifampin Izoniazid, rifampin s.a.

Rezistenta bacteriilor indusa de plasmide se realizeaza prin mecanisme biochimice diferite (tabel nr. 11), cum ar fi inactivarea antibioticului prin modificari enzimatice, blocarea transportului antibioticului in celula, modificarea structurala a „tintei”, antibioticului, utilizarea unei cai metabolice alternative celei perturbate de antibiotic. Prezenta plasmidelor R confera bacteriilor patogene proprietatea de a rezista la concentratii normal letale de antibiotic, creând mari dificultati in terapia infectiilor bacteriene. Situatia este agravata de posibilitatea transferului plasmidelor R de la bacteriile autohtone purtatoare, la bacteriile alohtone patogene, chiar daca apartin altor specii si genuri .

Tabel nr. 11. Mecanisme de rezistenta la antibiotice mediata de plasmide

Antibiotic	Mecanism de rezistenta
Peniciline si cefalosporine	Clivarea inelului β -lactamic de catre β -lactamaze
Aminoglicozide	Modificare prin acetilare, adenilare, fosforilare
Cloramfenicol	Modificare prin acetilare
Eritromicina	Schimbarea tintei prin metilarea ARNr
Tetraciclina	Reducerea ptrunderii si cresterea eliminarii antibioticului
Sulfonamide	Eliminarea activa si reducerea afinitatii antibioticului pentru enzima tinta

Faptul ca membrii microbiotei intestinale normale (*E. coli*, *Proteus sp.*), poarta frecvent plasmide R, are si o alta semnificatie legata de caracterul unor bacterii de a fi conditionat patogene (oportuniste) putând determina infectii, uneori destul de severe la gazde compromise din punct de vedere imunologic.

Plasmidele R exista si in comunitati care nu au venit in contact cu substantele antibiotice, prezenta lor fiind explicata de diversi autori, ca având rolul de a proteja bacteriile producatoare fata de actiunea propriilor lor produsi sau de a proteja bacteriile din sol fata de actiunea antibioticelor eliminate de bacteriile producatoare in mediul extern. O alta explicatie care se da la ora actuala extinderii fenomenului de rezistenta la antibiotice este aceea ca antibioticele inesei, insuficient purificate, ar contine fragmente de ADN care codifica aceasta proprietate, provenind de la tulpinile producatoare de antibiotice utilizate in industria farmaceutica. Frecventa rezistentei multiple la antibiotice a crescut de la 0,2% in 1958, la 58% in 1965, ajungând in prezent in unele medii spitalicesti la 93% pentru *E. coli* si 95% pentru *Proteus*. Cea mai frecventa este rezistenta la tetraciclina (95%), urmata de streptomicina, ampicilina, cloramfenicol si kanamicina. Importanta acestor date decurge si din faptul ca la om, *E. coli* reprezinta aprox. 80% din populatia bacteriana aeroba facultativ anaeroba din intestin.

Semnificativ este și faptul că tulpinile rezistente nu ar avea nici un avantaj selectiv, dacă antibioticele nu ar fi prezente. Paradoxal este că antibioticele, chiar dacă sunt cei mai buni agenți pentru tratarea infecțiilor bacteriene, sunt în același timp agenții care selectează și determină propagarea bacteriilor rezistente la antibiotice. Expertii în boli infecțioase din SUA estimează că în cel puțin jumătate din cazuri, administrarea antibioticelor la om este nenecesară. Nivele similare sau mai mari de folosire necorespunzătoare a antibioticelor s-au găsit și în alte părți ale lumii, dar adevărata extindere a acestui fenomen în lume rămâne necunoscută. Când folosirea necorespunzătoare înseamnă o utilizare în exces, aceasta reprezintă o forță selectivă neterapeutică pentru propagarea tulpinilor rezistente la antibiotice. Studii comparative (de ex. SUA - Venezuela - China, 1990) demonstrează o prevalență a tulpinilor bacteriene rezistente în țările dezvoltate, față de cele în curs de dezvoltare. Un studiu comparativ realizat de către colective din Franța și Jordania a demonstrat existența unui mare număr de tulpini de enterobacterii rezistente la cloramfenicol, un antibiotic a cărui utilizare a scăzut mult în ultimul deceniu în țările respective, ca și la noi în țară, datorită unor efecte secundare nedorite. Aceasta sugerează că determinanții de rezistență pot persista în microbiota intestinală, chiar atunci când presiunea selectivă diminuează, probabil datorită „agregatelor de plasmide”, care codifică rezistența la antibiotice.

Utilizarea antibioticelor ca agenți fitoterapeutici și pentru tratarea bolilor infecțioase ale animalelor (mamifere, păsări, pești, albine), face ca antibioticele să fie dispersate în cantități mari în mediul natural, având același impact ecologic ca și în cazul uzului uman, respectiv selecția bacteriilor rezistente. Chiar dacă aceste bacterii nu sunt infecțioase pentru om, ele se adaugă la fondul de gene de rezistență din mediu, care pot fi transferate la alte specii și genuri de bacterii, inclusiv la cele patogene pentru om. Spre exemplu: speciile fitopatogene ale genului *Mycoplasma* (combatute cu tetraciclină, cloramfenicol, eritromicină) sunt foarte diferite de *Mycoplasma pneumoniae* care determină infecții respiratorii la om, dar pot face schimb de gene de rezistență la antibiotice; speciile de *Erwinia* determină boli ale pomilor fructiferi, care se tratează cu streptomycină, oxitetraciclină; acest gen face parte din fam. *Enterobacteriaceae* (care include *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*), bacteriile acestei familii putând schimba gene între ele.

S-au făcut studii care au demonstrat că transferul de plasmide între bacterii are loc într-o varietate de habitate naturale: tractul gastro-intestinal al omului și animalelor (care reprezintă rezervorul principal de gene de rezistență la antibiotice și locul de predilecție unde are loc transferul de gene, cum o dovedesc studiile pe soareci gnotobiotici), ape uzate, apa de mare, apa de râu, apa de lac, în sedimente, în sol, în rizosferă.

Un rol important în răspândirea rezistenței infecțioase (plasmidiale) la antibiotice l-a avut, pe lângă utilizarea largă și nejustificată a acestora în profilaxia și terapeutică bolilor infecțioase umane și animale, includerea lor în alimentația animală (ca antibiotice furajere), cu scopul de a asigura creșterea animalelor tinere și de a ameliora starea lor generală și rezistența la boli. Introducerea nutretului cu adăus de antibiotice (tetraciclină) în hrana animalelor într-o fermă, este urmată în scurt timp de apariția tulpinilor bacteriene rezistente în microbiota intestinală a animalelor, ca și în cea a personalului fermei.

Rezistența la antibiotice nu poate fi constrânsă de granițe locale sau naționale, de aceea confruntă întreaga lume. Incorectă utilizare (fie prin automedicație, în spitale, în zootehnie, în agricultură) poate genera un factor de mediu adițional pentru selectarea și menținerea tulpinilor bacteriene rezistente. Acestea sunt diseminate foarte repede, purtate de oameni, animale și produse alimentare de origine animală și vegetală. Infecțiile umane cu bacterii rezistente la antibiotice fac tratamentul dificil prin limitarea spectrului de antibiotice utilizabile. Efectul dual al antibioticelor, atât benefic - antiinfecțios, cât și negativ - de inducere a rezistenței, ca și ușurința cu care se pot răspândi tulpinile rezistente, trebuie să determine utilizarea rațională a acestor medicamente și monitorizarea impactului lor asupra comunităților bacteriene.

Bacteriile Gram negative sunt considerate în general mai rezistente decât bacteriile Gram pozitive la agenți antimicrobieni. Plasmidele acestor bacterii (de exemplu: *E. coli*) conferă rezistență nu numai la antibiotice, ci și la metalele grele (de exemplu: ioni metalici din clorura mercurică). S-au făcut studii care au demonstrat că rezistența la antibiotice și metale grele la tulpini de *E. coli* izolate de la om, din apă de râu, ape reziduale, alimente. Frecvența rezistenței la antibiotice și metale grele la tulpini de *E. coli* izolate din alimente reflectă gradul de contaminare a mediului cu aceste substanțe. Prin urmare, prezența în probele de alimente a tulpinilor de *E. coli* multirezistente la antibiotice și metale grele reprezintă un potențial risc de îmbolnăvire (*health hazard*) pentru consumatori.

Microbiologii sunt în prezent alertați de emergența enterobacteriilor care prezintă rezistență multiplă la antibiotice. Unul din mecanismele prin care rezistența poate apărea la tulpini anterior sensibile este transferul fără bariere de specie și gen al plasmidelor R, transfer ce se face cu multă ușurință în intestin unde densitatea populațională a enterobacteriilor este foarte mare. Bacteriile Gram negative enterice posedă în mod obișnuit o singură plasmidă mare care codifică rezistența la câteva antibiotice. De exemplu, la *K. pneumoniae* sunt prezente gene care codifică sinteza β -lactamazei, gene care codifică factori de virulență pentru sideroforul

aerobactina si operonul *cf29*, care codifica o adezina nefimbriala CF29K (implicata in fenotipul difuz de aderenta), toate gasindu-se pe aceeasi plasmida conjugativa.

Enterococii (bacterii Gram pozitive incadrate inainte in genul *Streptococcus*, care apartin in prezent genului *Enterococcus sp.*) fac parte din microbiota intestinala. Inainte de identificarea tulpinilor de enterococi multirezistente la antibiotice la sfârșitul anilor '70, enterococii erau considerati bacterii relativ inofensive. Dupa doua decenii, enterococii au fost identificati ca agenti ai infectiilor nosocomiale, cu o frecventa in crestere si in paralel cu o dobândire a rezistentei la majoritatea substantelor antibiotice utilizate. Ca rezultat, enterococii au devenit agenti emergenti, cauza unor infectii dificil de tratat.

Emergenta enterococilor rezistenti la vancomicina a alarmat lumea medicala, din câteva motive: 1) dobândirea rezistentei la vancomicina de catre acesti agenti oportunisti, restrânge mult optiunile medicilor clinicieni pentru conducerea tratamentului infectiilor determinate de acestia; 2) experimentele de conjugare au confirmat transferul genelor de rezistenta la vancomicina, de la enterococi la *S. aureus*; 3) studiile epidemiologice din S.U.A. si Europa au identificat diferite presiuni selective care favorizeaza proliferarea si expansiunea populatiilor de enterococi rezistenti la vancomicina; 4) rezultatele modeste obtinute in ultimul deceniu in prevenirea si controlul strategiilor pentru limitarea rezistentei la vancomicina (ca si a rezistentei la meticilina la stafilococi), au reliefat dificultatea problemei, odata aparuta.

Studii recente au aratat ca alterarea starii de echilibru a microbiotei sub actiunea antibioticelor administrate irational, favorizeaza infectiile parazitare intestinale cu tulpini virulente (ex. *Giardia duodenalis*, *Hymenolepis nana*).

Studiul factorilor care determina aparitia si raspândirea rezistentei la antibiotice, cunoasterea determinantilor genetici ai rezistentei si a mecanismelor moleculare prin care pot fi eliminate plasmidele R din celulele bacteriene (fenomenul de vindecare), constituie obiective ale cercetarii microbiologice actuale, cu importanta practica si teoretica deosebita.

Metoda discurilor pentru determinarea sensibilitatii bacteriilor la antibiotice (vezi cap. Principii de diagnostic microbiologic) poate sa nu detecteze intotdeauna tulpinile rezistente, mai ales când se testeaza cefalosporinele, astfel ca se recomanda utilizarea metodei dilutiilor (fig. 58) si metoda E test (fig. 46). Detectarea tulpinilor rezistente este importanta pentru pacient, dar si pentru monitorizarea infectiilor nosocomiale si a fenomenului de rezistenta la antibiotice in ansamblu.

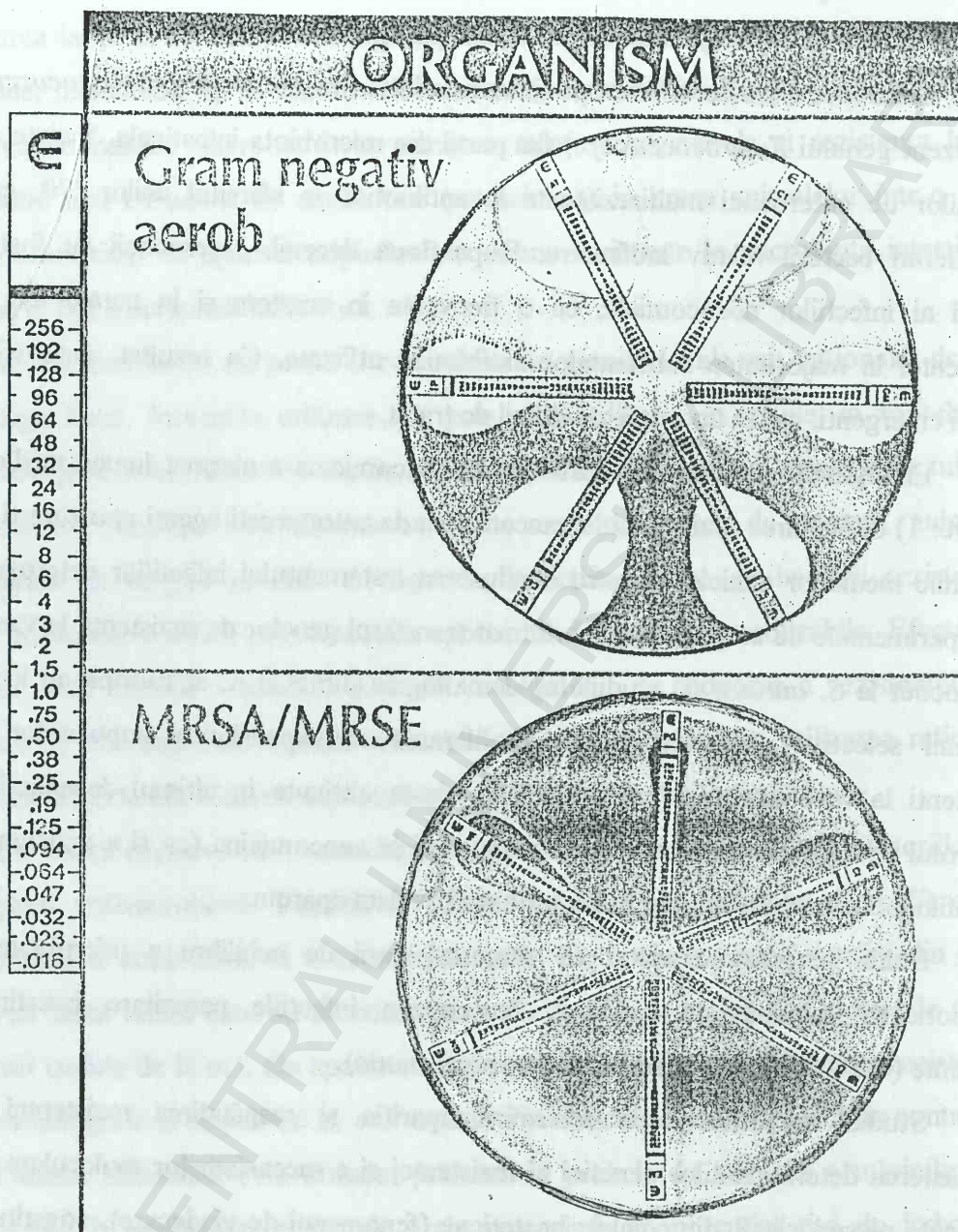


Fig. 46,a, b. Metoda E-test, care permite determinarea simultana a sensibilitatii unei tulpini bacteriene la un set de antibiotice si a concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) a antibioticelor active pe tulpina testata. Determinarea C.M.I. este posibila datorita faptului ca benzile de plastic neporos utilizate, contin de-a lungul lor antibiotice imobilizate (pe fata opusa scalei C.M.I. – in stânga imaginii), cu concentratii precise, care acopera 15 dilutii binare; când benzile sunt transferate pe mediul solid din placi, insamântat cu tulpina de testat, gradientul continuu de antibiotice va determina aparitia unor zone elipsoidale de inhibitie a cresterii tulpinii testate, iar valoarea C.M.I. se citește acolo unde elipsa intersectează scala de valori C.M.I.

a) tulpina bacteriana Gram negativa sensibila la toate antibioticele setului ;
b) tulpina bacteriana Gram pozitiva (*Staphylococcus* sp. metilino-rezistent) plurirezistenta la antibiotice.

Notiuni generale de Micopatologie

O lunga perioada de timp microfungii au fost priviti ca agenti infectiosi nesemnificativi, iar laboratoarele clinice erau putin interesate in dezvoltarea serviciilor de micologie. In ultimii ani insa, literatura de specialitate a demonstrat un interes crescut reflectat in numarul mare al raportarilor de cazuri de infectii fungice.

Desi microfungii sunt recunoscuti in prezent ca o cauza importanta a infectiilor, marea majoritate a laboratoarelor ofera servicii minimale de micologie. Cauza nu este bine definita, o cauza posibila insa ar putea fi si programele educationale care au fost mai putine in acest domeniu, probabil datorita "mitului" ca micologia este greu de invatat. In prezent, numarul programelor educationale care prezinta aspecte practice ale micologiei clinice, ca si al cartilor si publicatiilor stiintifice in acest domeniu a crescut, astfel ca micologia a devenit mai accesibila laboratoarelor de microbiologie clinica si un component important al acestora.

Semnificatia medicala a fungilor. Exista mai mult de 50.000 - 100.000 de specii validate de fungi, dar numai 50 (dupa alti autori 75 sau 100) de specii sunt general recunoscute ca patogene pentru om. Aceste microorganisme eucariote au in mod normal o existenta saprotrofa in natura, in medii cu substante azotate in descompunere, fiind capabile insa si de un ciclu parazitic la om si animale. Infectiile generate de microfungi – *micoze*, nu sunt transmisibile in sensul comun al cuvântului, de la o persoana la alta, sau de la animale la om. Omul poate devini o gazda accidentala prin inhalarea sporilor sau prin patrunderea lor in tesutul traumatizat. Cu exceptia fungilor dimorfi, omul este in general rezistent la infectii fungice. Totusi, o alterare a functionalitatii sistemului imunitar al gazdei poate favoriza aparitia unor infectii cu fungi considerati in general nepatogeni. Astfel de infectii se pot produce la pacienti cu boli debilitante cum ar fi diabetul zaharat, leucemii si limfoame, in sindromul de imunodeficienta dobândita (SIDA) ca urmare a infectiei cu virusul HIV, ca si in supresia functiei imunitare instalata postcorticoterapie (medicamente antiinflamatoare administrate cu scopul evitarii fenomenului de respingere a grefelor, ca si in bolile autoimune). In ultimii ani a crescut foarte mult numarul infectiilor cauzate de fungi saprotrofi la pacienti imunocompromisi. Alti factori favorizanti includ alcoolismul si consumul de droguri, dar si o serie de proceduri medicale cum ar fi cateterizarea intravenoasa prelungita, interventii chirurgicale gastrointestinale, antibioterapia de lunga durata. In ultimul timp, in micologia medicala interesul s-a deplasat de la infectiile superficiale, dermatologice, la cele ale tesuturilor profunde, care pun grave probleme de diagnostic si tratament. S-a impus cu necesitate si dezvoltarea metodelor de testare a sensibilitatii

microfungilor la antibiotice, care trebuie sa ia in considerare o serie de particularitati ale microfungilor, cum ar fi cresterea miceliana, tendinta de formare de agregate si de aderenta la suprafata interna a tuburilor, care modifica sensibilitatea celulelor la antibiotice.

Fungi frecvent întâlniti in laboratoarele clinice . Din cele 50.000 – 100.000 de specii, mai putin de 100 au fost izolate din probele clinice. Intr-un laborator dat, foarte putine specii se întâlnesc foarte frecvent, fiind cunoscut faptul ca exista diferente in distributia geografica a anumitor fungi. Frecventa lor este dependenta si de tipul de proba biologica analizata. Astfel:

- din sânge sunt frecvent izolate speciile: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida lusitaniae*, *C. krusei*, *Saccharomyces sp.*, *C. pseudotropicalis*, *C. zeylanoides*, *Trichosporon sp.*, *Coccidioides immitis*, *Candida guilliermondii*, *Malassezia (Pityrosporum) furfur*;
- din lichidul cefalorahidian se izoleaza speciile: *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*;
- din tractul genitourinar se izoleaza speciile: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Penicillium sp.*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Saccharomyces sp.*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Trichosporon sp.*, *Alternaria sp.*
- din tractul respirator se izoleaza diferite specii de levuri, cu exceptia speciei *Cryptococcus neoformans* si numeroase specii de fungi filamentosi (mucegaiuri), cum ar fi: *Penicillium sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor*, *Cladosporium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium sp.*, *Trichosporon sp.*, *Alternaria sp.*, *Acremonium sp.*, *Scopulariopsis*;
- de pe tegumente se izoleaza speciile: *Trichophyton rubrum*, *Alternaria*, *Candida albicans*, *Penicillium sp.*, *Scopulariopsis*, *Epidermophyton sp.*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus sp.*, *A. versicolor*, *Acremonium sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Trichosporon sp.*

Infectii fungice.

Infectiile fungice, denumite generic **micoze**, se caracterizeaza printr-o simptomatologie atipica, nespecifica, care reduce sansele diagnosticului clinic. Bolnavii pot prezenta frecvent simptome cum ar fi: stare de subfebrilitate, transpiratii nocturne, scadere ponderala, moleseala, usoara fatigabilitate (oboseala), tuse, dureri de piept. Infectiile fungice cu localizare profunda sau

diseminate, pot mima alte infectii, cum ar fi TBC, bruceloza, sifilisul sau boli maligne diseminate. O atenta examinare a pielii si mucoaselor este obligatorie, pentru ca infectiile sistemice prezinta adesea si leziuni cutaneo-mucoase.

Anamneza poate contine date privitoare la o calatorie recenta intr-o regiune endemica pentru infectiile fungice, la o participare la activitati care fac ca pielea sa vina in contact direct cu animale infectate sau materiale contaminate, la posibilitatea inhalarii de spori fungici, date care trebuie luate in considerare.

A. Caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de levuri (drojdii)

Levurile sunt microfungi a caror forma de existenta este unicelulara si care se multiplica asexuat prin inmugurire. Reprezinta un grup heterogen de microorganisme, incadrate atât in *Cls.* *Fungi imperfecti*, care se multiplica doar pe cale asexuata, cât si in *Cls.* *Ascomycetes*, care se multiplica asexuat si sexuat (prin ascospori formati in celule diferite – asce, rezultate din fuziunea a doua celule haploide α si α , apartinând la tipuri opuse de imperechere).

Exista in jur de 150 de specii de levuri ascosporogene clasificate in prezent in genul *Candida*. Dintre acestea, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* reprezinta mai mult de 80% din izolatele clinice de *Candida*, in timp ce altele sunt izolate sporadic si sunt considerate mai putin virulente. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* si *C. guilliermondii* pot determina infectii urinare, meningite si fungemie. Alte specii apar doar ca patogeni oportunisti; de exemplu, *C. lipolytica*, *C. krusei* pot fi asociate fungemiei. *C. lusitaniae* a fost recunoscuta recent ca un patogen important datorita rezistentei la amfotericina B. S-a raportat recent ca si alte genuri de levuri, considerate de obicei nepatogene, pot determina vulvovaginite, fungemie (*S. cerevisiae*) si endocardite (*Torulopsis sp.*). Genul *Torulopsis* – include levuri nefilamentoase, necapsulate cu inmuguriri multiple. Recent, pe baza rezultatelor analizelor genetice la nivel molecular, speciile acestui gen au fost incadrate in genul *Candida*. *C. glabrata* este un saprofit al pielii si mucoaselor, care determina in anumite conditii vaginite, infectii viscerale (renale), sistemice si septicemii. *C. albicans* ramâne insa levura cel mai frecvent izolata in clinica, fiind agentul etiologic cel mai comun, izolat din infectii severe ale mucoaselor, pielii si unghiilor.

Dintre factorii de virulenta ai speciilor de *Candida*, aderenta la suprafata celulei-gazda, **producerea de fosfolipaze, proteinaze si siderofori**, ca si **formarea de hife**, acesta din urma fiind factorul care ajuta la evaziunea levurii de mecanismele de aparare imuna ale gazdei.

Candida albicans. (denumiri anterioare : *Oidium albicans*; *Monilia albicans*).

Specia *Candida albicans* este o specie ubicvitara, fiind gasita pe plante, dar si ca un component al microbiotei normale a tractului digestiv, a tegumentelor si mucoaselor la om, frecvent izolata in clinica, fiind un patogen oportunist. Ca toate levurile este acidofila, dezvoltându-se optim la un $\text{pH} = 5 - 6,5$, utilizeaza carbonul organic: glucide (testele de fermentatie si asimilatie sunt foarte utile identificarii – vezi Anexa VIII), alcooli, acizi, inulina; este keratolitica.

C. albicans este o ciuperca microscopica dimorfa, prezentând fazele de drojdie (celule unice) si miceliana (pseudomicelii si tuburi germinative), in functie de conditiile de mediu. Dimorfismul speciei *Candida albicans* suscita un interes deosebit, deoarece formarea hifelor este considerata a fi un proces cu semnificatie patologica. Diferentele in exprimarea antigenelor de suprafata, care se produc concomitent cu modificarile morfologice la nivelul peretelui celular, au un efect pronuntat asupra proprietatilor de aderenta la substrat si implicit asupra virulentei. Componentele de suprafata exprimate diferit la cele doua morfe, moduleaza relatia gazda-parazit, aderenta si invazia celulelor - gazda, semnalizarea celulara si interactiunea cu fagocitele. Astfel, in candidoze se pot observa celule levurice, pseudomicelii si tuburi germinative (fig. 47), care pot fi dificil de diferentiat de filamentele miceliene ale microfungilor dermatofiti. In sputa sau abcese subcutanate se pot evidentia elemente levuriforme. Aderenta la substratul celular poate fi urmata de invazie hifala si pseudohifala cu tulpini virulente de *C. albicans*, in timp ce colonizarea cu specii mai putin virulente poate fi limitata la straturile cheratinizate.

Colonizarea intestinului (considerat un organ la fel important ca multe alte organe pentru mentinerea homeostaziei organismului prin "efectul de bariera" al microbiotei intestinale) cu microorganisme exogene nu determina neaparat simptome de boala, mai ales daca gazda este imunocompetenta. Totusi, unele dintre aceste microorganisme sunt potential patogene mai ales daca gazda este imunosupresata. In plus, pentru a preveni colonizarea cu microorganisme exogene, un rol secundar al efectului de bariera este acela de a mentine microorganismele endogene in numar mic, mai ales a acelora care, desi intotdeauna prezente in microbiota normala a subiectilor sanatosi, pot deveni patogene daca numarul lor creste. Un astfel de patogen "oportunist" este si specia *C. albicans*.

S-a demonstrat, mai ales pe modele experimentale, ca efectul de bariera poate fi influentat de diferiti factori cum ar fi dieta, stresul psihologic, dar si de tratamentele

antimicrobiene care determina multiplicarea microorganismelor rezistente si emergenta celor potential patogene, pâna atunci mentinute intr-o stare de echilibru (eubioza), de relatiile cu

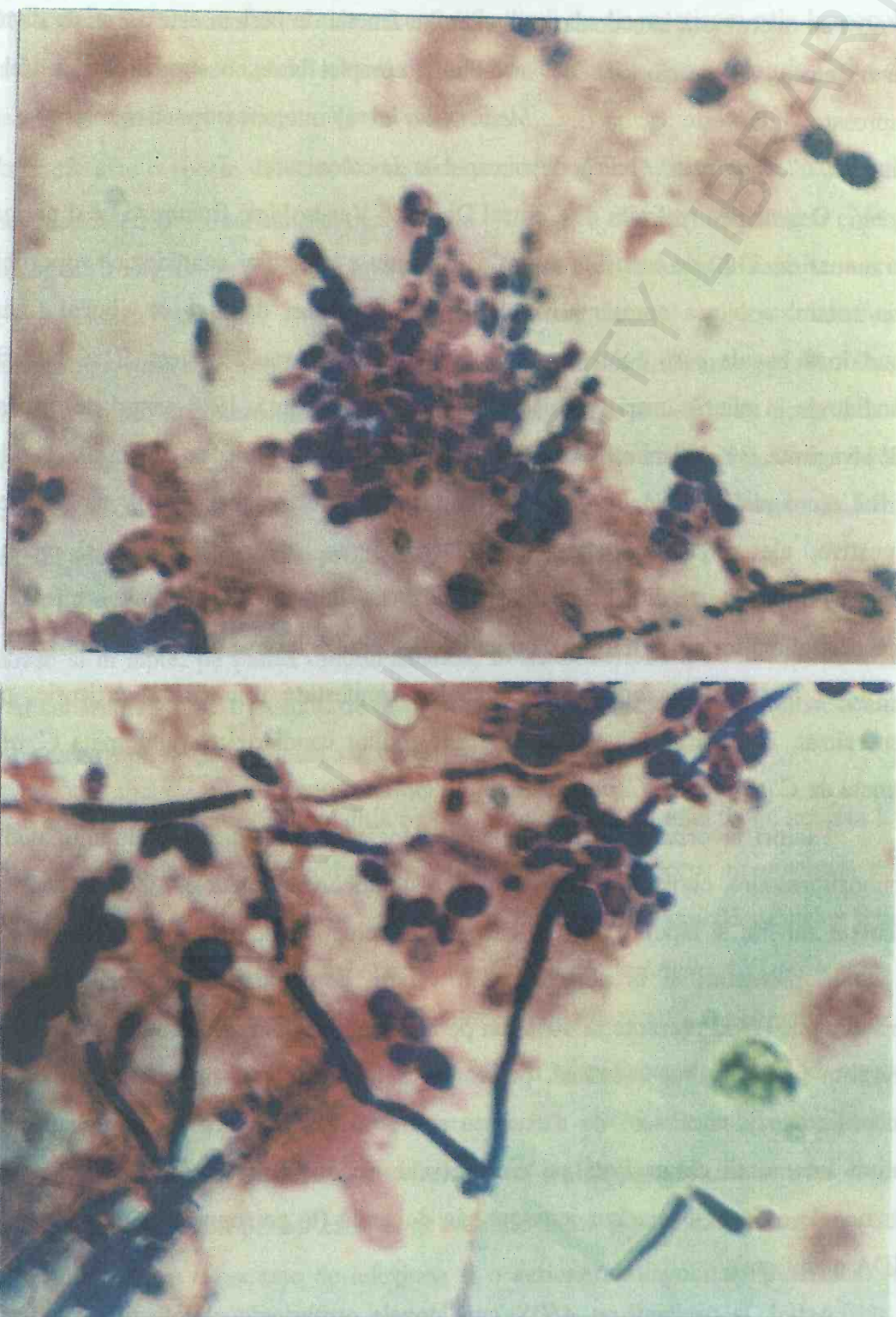


Fig. 47, A si B. Imagini de microscopie optica ale unor frotiuri efectuate din secretie vaginala, dintr-o infectie candidozica (*C. albicans*); A) – celule inmugurite si pseudohife rezultate prin inmuguriri repetate, neurnate de separarea celulelor levurice; B) celule levurice tipice si tuburi germinative (marire : x 2500).

speciile asociate, «ecosistemul» respectiv evoluând spre starea de dezechilibru (disbioza). Pentru ca microbiota intestinala sa-si exercite functia de bariera este esentiala diversitatea sa, ori un tratament cu antibiotice, desi nu elimina complet biota, o simplifica si astfel specii normal supresate, cum este cazul *C. albicans*, dar si al anumitor specii bacteriene (*Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*), devin capabile de colonizare.

O statistica realizata de Centrul Dermato-Venerologic Bucuresti pe o perioada de 5 ani si un numar de 3392 de cazuri, a aratat o incidenta a infectiilor candidozice superficiale de 26.5%. Din totalul acestora aproximativ 41 % au fost cazuri de *muguet* bucal (margaritarel) sau candidoza bucala care poate interesa mucoasa, limba sau faringele, 21% cazuri de intertrigo candidozic la pliurile mari (inghinale, submamare, axilare), 19% cazuri de onixis si perionixis, 13% vaginite, 3% balanite, 2% perles comisural si 1% otomicoze. Infectii viscerale: in domeniul O.R.L. (amigdalite, laringite, sinuzite, otomicoze), oculare, respiratorii, cardiovasculare, urinare, digestive, ale sistemului nervos central (meningite, abcese cerebrale si medulare, al caror diagnostic este foarte dificil; infectii generalizate – fungemie, septicemie – infectii grave, aparute in special dupa tratamente masive cu antibiotice antibacteriene sau postcateterizare. S-au raportat si cazuri de alergii la antigene candidiale, manifestate prin colita, urticarie, prurit anal sau generalizat. In ceea ce priveste etiologia infectiilor candidozice, predomina *C. albicans* (80%), urmata de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*.

Factori favorizanti ai infectiilor candidozice sunt medicamentele antipaludice de sinteza, imunosupresoare, citostatice, psihotrope, ca si anticonceptionalele, afectiuni endocrine, cum ar fi diabetul zaharat si hipotiroidismul, cancerul si hemopatiile. Astfel de infectii sunt mai frecvente la copiii prematuri si la persoanele in vârstă, la persoanele cu carii dentare si inflamatii periodontale (fiind prezente la 40% din persoanele purtatoare de proteza), cu amigdalita cronica. Prezenta in rezervorul intestinal, determina o frecventa mai mare a infectiilor vulvo-vaginale. Infectiile candidozice sunt de asemenea mai frecvente la persoanele iradiate, la cele care au suferit interventii chirurgicale pe cord deschis (endocardite si septicemii), la narcomani si la persoanele cu deficit imunitar innascut sau dobândit (la persoanele infectate cu HIV si cu boala SIDA manifesta).

Astfel, la pacientii cu *AIDS*, candidozele orofaringiene (infectii secundare, oportuniste) sunt frecvente, fiind semnalate la la 50% dintre subiectii infectati cu HIV si la 90% dintre pacientii cu *AIDS*. Situsurile principale ale infectiei bolnavilor candidemici sunt plamânul, cateterele, epiteliul urinar sau numai tubul digestiv. Cazurile de candidemie survin adesea si la

bolnavii cu leucemii si carcinom orofaringian. Factorii de risc in aparitia candidemiei sunt prezenta unui cateter central, neutropenia, colonizarea intestinala cu levuri. Datorita mortalitatii ridicate (95%) a cazurilor de candidoze sistemice si dificultatii de diagnosticare prin hemoculturi sau biopsii, s-a incercat punerea la punct a unor metode de detectare a antigenelor de *Candida*, a anticorpilor sau a unor metaboliți fungici in serul pacientilor.

C. krusei este o specie descrisa la om ca un microorganism de tranzitie, izolat relativ rar de pe mucoase si cu o semnificatie clinica minora. Recent, a devenit un patogen emergent notabil, cu un spectru larg de manifestari clinice care cuprinde fungemie, endoftalmita, artrita si endocardita, majoritatea infectiilor având transmitere nosocomiala si incidenta crescuta la pacientii imunocompromisi. Frecventa mare a cazurilor de *AIDS* si utilizarea pe scara larga a noului antimicotic triafol-fluconazol in infectiile fungice la acesti pacienti, au contribuit la o crestere semnificativa a incidentei infectiilor cu *C. krusei*, datorita rezistentei levurii la acest medicament, chiar daca aceasta specie este mai putin virulenta decât *C. albicans* in termenii capacitatii sale de aderenta, potentialului proteolitic si producerii de fosfolipaze.

Cryptococcus neoformans este o levura prezenta in sol, de unde poate ajunge pe fructele zemoase si in lapte, pe pielea omului sanatos, in materiile fecale, ca si in excrementele porumbeilor si canarilor. Nu se transmite de la persoana la persoana sau de la animal la animal. Se transmite pe cale respiratorie, cutanata sau digestiva.

Infectia cu *HIV* poate constitui conditia predispozanta si pentru infectia cu aceasta levura saprotrofa, dar care inhalata poate produce infectii fatale. *Cryptococcus neoformans* este o bazidiomiceta capsulata care creste in faza haploida, dar in conditii favorabile celulelor tipurilor opuse de imperechere produce o teleomorfa denumita genul *Fillobasidiella*. Criptococoza este generata de inhalarea celulelor de levuri sau de bazidiospori din mediu. La majoritatea indivizilor infectia ramâne localizata in plamân, dar levura poate fi diseminata determinând meningita criptococala, cel mai adesea la pacientii imunocompromisi (80 – 90 % din infectiile criptococale sunt întâlnite la pacientii cu *HIV*). Factorul de virulenta cel mai important este stratul capsular gros (fig 48) al carui constituent primar este un polizaharid numit **glucuronoxilomanan (GXM)** care confera levurii o mare capacitate de adeziune si o actiune antifagocitara puternica. Acest polizaharid este unul dintre cei mai puternici activatori cunoscuti ai sistemului complement, atât pe calea alternativa, cât si pe calea clasica (dupa legarea anticorpilor specifici) si determina si cea mai serioasa complicatie a criptococozei la pacientii cu *AIDS*, respectiv cresterea presiunii

intracraniene determinata de vâscozitatea extraordinara a solutiei de polizaharid criptococal si de aparitia unor dopuri vâscoase de polizaharid si celule capsulate care pot bloca drenajul limfatic.

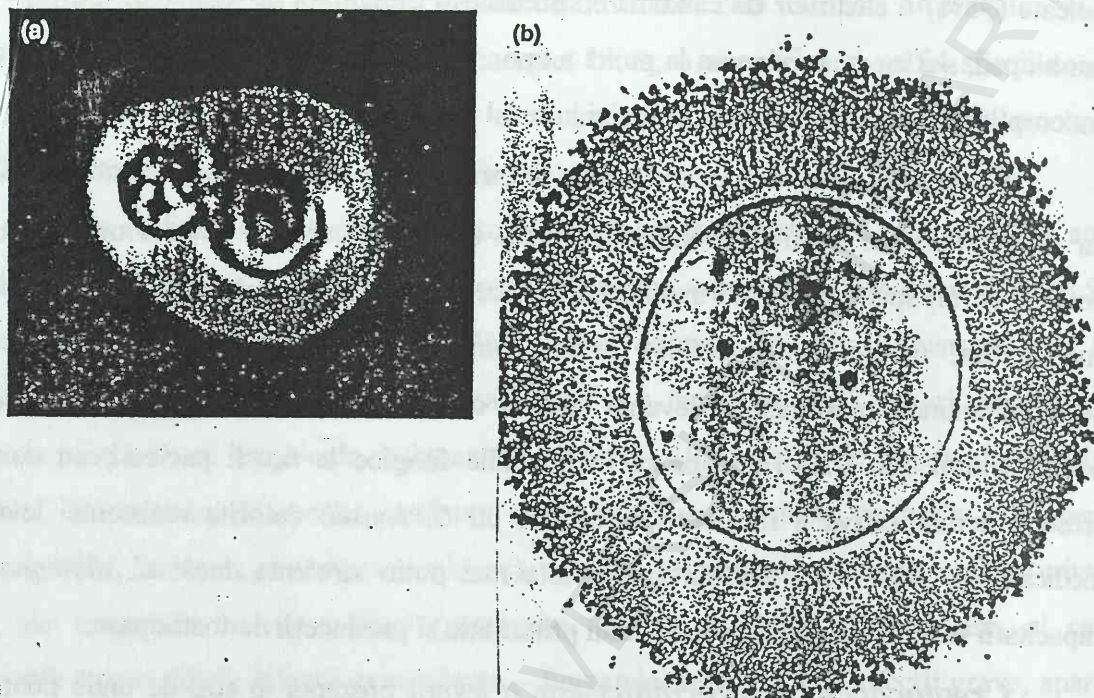


Fig. 48. Capsula levurii *Cryptococcus neoformans* :

- (a) Celule de *C. neoformans* colorate negativ cu tus de India, cu capsula groasa ;
- (b) Imagine la M.E.T. aratând localizarea fragmentului C3 legate de capsula levurii ; situsurile de legare a C3 au fost vizualizate prin colorarea cu imunoperoxidaza a ce lulelor preincubate cu ser uman.

Aderenta levurilor la suprafete inerte. Semnificatie medicala.

Importanta medicala a acestui proces este legata in special de utilizarea in medicina, in diferite scopuri, a biomaterialelor (materiale plastice polimerice, aliaje metalice). Gristina (1987) considera ca aproape orice om in societatile avansate din punct de vedere tehnologic este gazda pentru biomateriale, utilizate pentru substituirea permanenta sau temporara a tesuturilor, sub forma de implanturi dentare, proteze articulare, valvule cardiace, lentile de contact, plase si suturi, diferite tipuri de catetere. Comparativ cu studiile privind aderenta levurilor la alte suprafete inerte, relativ putine cercetari au fost intreprinse asupra aderentei levurilor aparținând genului *Candida* la suprafete de plastic, in ciuda potentialului de relevanta al acestei aderente pentru stomatitele dentare, ca si pentru infectiile dezvoltate pe materialele protetice de plastic si pe cateterele intravasculare si urinare.

Candidoza cronica atrofica este o complicatie comuna la purtatorii de proteza mai in vârsta, vârstnici, la care incidenta poate fi mai mare de 60%. Este o forma de candidoza bucala,

in care suprafata danturii acrilice actioneaza ca un rezervor de infectie. Aderenta *in vitro* la acrilat, ca si la celulele epiteliale bucale, este favorizata de cresterea levurii aflata in faza stationara de crestere in medii de cultura care contin mari concentratii de zaharuri ca sursa de carbon. Cresterea adeziunii levurii este corelata cu producerea unui strat fibrilar de suprafata, cu caracteristicile tinctoriale ale unui polizaharid anionic. S-a constatat ca pacientii cu candidoza cronica au o dieta in general bogata in glucide, iar dupa consumul de dulciuri, concentratia bucala de zaharoza a fost gasita mai mare de 600 mM. Celulele aflate in faza exponentiala de crestere sunt slab aderente la acrilat, ceea ce indica faptul ca acestor celule le lipseste stratul adeziv. Cationii divalenti si serul sanguin, favorizeaza adeziunea la acrilat; de exemplu, traumele palatale determina adsorbția componentelor serice la suprafata coroanelor dentare si pot fi un factor care initiaza colonizarea danturilor *in vivo*. Saliva, clorhexidina si *Streptococcus salivarius* sunt inhibitori.

Aderenta speciilor de *Candida* la suprafetele de plastic este implicata si in patogenia candidemiilor de cateter. Microscopia electronica de baleiaj a cateterelor infectate in mod natural, a relevat straturi de *Candida* aderenta si un material fibrin-like; factorii care initiaza colonizarea persistenta includ depunerea de fibrina si scaderea activitatii microbicide a fagocitelor in micromediul corpului strain. S-a testat capacitatea de aderenta a doua specii de levuri, *C. albicans* si *C. tropicalis*, fata de materialele plastice din care se confectioneaza cateterele si fata de materialele acrilice, observându-se ca specia *C. tropicalis* are o capacitate de aderare, fapt explicat prin hidrofobicitatea de suprafata, mai mare in cazul acestei specii, corelata cu continutul in acizi grasi, legati covalent de manoproteinele stratului fibrilar de suprafata.

Mai recent, s-a demonstrat ca si specia *C. krusei* are un potential semnificativ mai mare de a forma biofilme decât *C. albicans*, pe cateterele de policlorura de vinil, afinitatea mai mare pentru suprafetele de plastic fiind explicata tot in termenii hidrofobicitatii (de 5 ori mai mare a celulelor de *C. krusei*, comparativ cu *C. albicans*) ca si ai influentelor nutritionale.

Aspectul acesta, al formarii biofilmelor intr-un «ecosistem» medical este demn de semnalat, datorita faptului ca microorganismele sunt rezistente la dozele terapeutice uzuale de antibiotice, determinând infectii cronice, dificil de tratat si cum pacientii la care survin sunt adesea intr-o stare de imunosupresie, evolueaza spre "exitus"; dupa unii autori, mortalitatea cazurilor de candidoze diseminate este de 95%.

În ultimul timp, levurile au fost studiate și sub un alt aspect, acela al relațiilor lor antagonice cu specii patogene *in vivo*, relații ce ar putea fi exploatate prin utilizarea de preparate probiotice, în scopul prevenirii sau tratării unor infecții, prin alte mijloace decât antibioticele, considerate la ora actuală un "paradox", pentru că utilizarea lor prezintă mai multe neajunsuri, decât avantajele cunoscute. Astfel, s-a descris existența unui fenomen de antagonism microbian *in vivo* exercitat de către *Saccharomyces boulardii* față de diferite tulpini de *Candida*, în tractul digestiv al sobolanilor gnotoxenici. Acest efect antagonic, preventiv și curativ, prezintă o anumită specificitate, fiind activ contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* și inactiv față de *C. tropicalis*. Acest efect dispăre dacă celulele de *S. boulardii* sunt omorâte prin încălzire. Procesul a fost descris ca "primul exemplu al unui fenomen de antagonism microbian exercitat *in vivo* de către microorganisme care nu fac parte integrantă din ecosistemul tubului digestiv, dar pe care îl tranzitează în număr ridicat, fără a pierde viabilitatea". Cinetica eliminării intestinale a levurii *S. boulardii* a fost studiată și la voluntari, arătându-se că drojdia inhibă creșterea a numeroase microorganisme, determină creșterea efectului de barieră față de *Candida sp.*, reduce mortalitatea indusă de *Clostridium difficile* la rozatoarele infectate experimental (Pecquet și colab., 1991) și previne diareea acută și cronică determinate de tulpinile de *E. coli* enteropatogene, fără a fi eficientă însă față de tulpinile enterotoxigenice (McFarland, 1993). De fapt, acest adevărat agent farmacologic (mai curând decât un agent de manipulare ecologică) a fost descoperit prin investigarea unui remediu popular împotriva diareei, folosit în Indochina; în prezent este folosit în profilaxia și prevenirea recaderii colitei membranoase determinată de *C. difficile*. *S. boulardii* nu se plantează, dar supraviețuiește în număr mare pasajului și fără a afecta mărimea populației de *C. difficile*, leagă exotoxina produsă de acesta și o clivează cu o protează preformată. Pentru prevenirea infecțiilor post antibioterapie se studiază și posibilitatea administrării unor tulpini izolate din materiile fecale, dar există o dificultate legată de menținerea viabilității acestora în produsele comerciale.

Diagnosticul de laborator al infecțiilor determinate de levuri.

Testele de laborator indică un răspuns inflamator nespecific: viteza de sedimentare a sângelui (VSH) este crescută, leucograma indică neutrofilie și monocitoză moderate. Biopsiile au un rol important în diagnosticul rapid, mai ales al infecțiilor subcutanate.

Cultivarea levurilor se face pe mediu Sabouraud sau Y.P.G (vezi Anexa IX). Semnificatia prezentei celulelor de *Candida* in culturi este diferita, in functie de produsul patologic din care s-a facut insamântarea. Astfel, daca insamântarea s-a facut din sânge, urina, lichid cefalorahidian, focare inflamatorii inchise, prezenta levurilor are o semnificatie patologica. In interpretarea prezentei acestora pe mucoase si tegumente (unde pot exista in stare saprotrufa) se tine cont de specie si de abundenta elementelor. Prezenta exclusiva sau preponderenta a celulelor de *Candida* are semnificatie patologica. Specia *Candida albicans* este **un comensal al mucoaselor** (la om si animale), dar **prezenta sa in leziuni cutanate are semnificatie patologica**. Prezenta la persoanele sanatoase este in proportie de 7,5% in cavitatea bucala, de 15% in materiile fecale, de 5 – 15% in vagin la femeile negravidе si de 32 – 34% la femeile gravide. Pe tegumente pot fi prezente si speciile *C. krusei*, *C. parakrusei*. Specii cum ar fi *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* pot fi prezente in natura, iar *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. robusta* pot fi evidentiata in produsele lactate.

Recoltarea probelor patologice.

Pentru a face un diagnostic corect al micozelor, de mare insemnatate este modul de recoltare a probelor patologice, deoarece levurile nu au o raspândire egala in leziunile cutanate. In infectia numita *intertrigo candidozic*, caracterizata prin leziuni cutanate izolate sau confluate in placi zemuinde, recoltarea scuamelor din leziuni se face prin raclarea cu marginile unei lame slefuite, de la marginea leziunilor. In infectiile unghiilor numite *onixis* si *perionixis*, recoltarea se face de la extremitatea proximala a unghiei (unde este subtiata, dezlipita, deformata), din depozitul verzui-brun, ca si din tesutul periungheal inflammat. Exudatele si secretiile mucoaselor se recolteaza cu tamponul de vata steril sau cu ansa. Daca exista, se poate preleva din depozitul albicios-cremos si pseudomembrane, care trebuie examinate extemporaneu si insamântate pe diferite medii. Expectoratia se recolteaza, de preferinta, prin spalatura bronsica, dupa spalarea cavitatii bucale cu ceai de musetel, solutie de hipermanganat de potasiu (1 ‰), rivanol (1%) sau alt antiseptic. Materiile fecale se recolteaza in coprorecoltoare, pe o solutie de penicilina / streptomicina in apa fiziologica sterila, pentru a inhiba cresterea bacteriilor. Puroiul din leziunile inchise se recolteaza prin punctie aseptica. Pentru disocierea produsului de examinat se folosesc solutii de Na_2S – 10% (actioneaza la rece si realizeaza o clarificare rapida), sau de KOH – 40% (actioneaza la cald, dar trebuie evitata fierberea amestecului).

Prelucrarea probelor in laborator in scopul identificarii microfungilor se face la fel ca si in cazul bacteriilor: examen microscopic direct al preparatelor proaspete L/l, al frotiurilor colorate (au caracter de Gram pozitive), cultivare pe medii de izolare si cultivare (Sabouraud),

urmata de examinarea caracterelor de cultura si morfologice, determinarea capacitatii de formare de tuburi germinative (prin metoda culturilor între lame imersate in mediu de cultura, insamântat în striuri si acoperit cu lamela – vezi p. 127) ca si pe medii speciale pentru identificarea biochimica (teste de fermentatie si asimilatie – vezi Anexa VIII) ; sunt disponibile si galerii miniaturizate (microtest) tip API : API Candida si API 20 C AUX, cu perioada de incubare de 18 - 24 ore si respectiv, 24 – 48 ore. Este util si diagnosticul imunologic, prin teste serologice clasice sau teste rapide de latex –aglutinare. În final, se recomanda întocmirea unor rapoarte de caz detaliate, mai ales ale celor complicate.

Cryptococcus neoformans se evidentiaza pe preparate microscopice sub forma de celule rotunde, capsulate, care prezinta inmugurire multipolara; prezenta lor în numar foarte mare este semnificativa si mai ales daca recoltarea s-a facut prin bronhoscopie, altfel este considerata întâmplatoare. Evidentierea în bila, urina, materii fecale se face numai prin cultivare (mai rar prin examen microscopic). Se utilizeaza mai putin preparate colorate; la coloratia Gram, ca toate levurile, are caracter Gram pozitiv.

Alte specii de levuri patogene. *Coccidioides immitis*. Face parte dintre fungii dimorfi, care exista în forma filamentoasa în sol si ca sferule în tesuturi. Filamentele formeaza artrospori usori, diseminati cu ajutorul vântului (fig. 49).

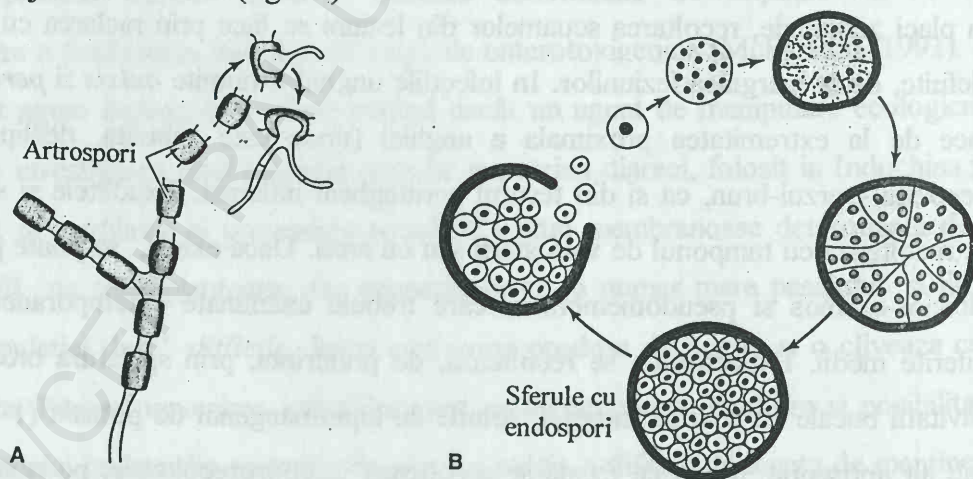


Fig. 49. Stadii de existenta ale speciei *Coccidioides immitis*. A. Artrospori formati la capetele hifelor în sol. Prin germinare în sol se formeaza noi hife ; daca sunt inhalati, artrospori se diferentiaza în sferule. B. Endospori formati în sferule, la nivelul tesuturilor ; la ruperea sferulelor, endosporii disemineaza si formeaza noi sferule.

Patogenie. Artrospori inhalati, în plămâni formeaza sferule cu $\phi = 30 \mu\text{m}$, cu perete celular gros, care sunt pline cu endospori. După ruperea peretelui celular, endosporii sunt eliberati si se diferentiaza în noi sferule. Organismul poate fi invadat din aproape în aproape sau pe cale sanguina, infectia fiind denumita coccidiomicoza. Leziunile granulomatoase apar mai ales în

maduva osoasa si in sistemul nervos central (meninge). Diseminarea din plamân in alte organe se produce la persoane cu deficit al imunitatii mediate celular. Majoritatea persoanelor infectate (75%) sunt asimptomatice si dezvoltă o reactie de hipersensibilitate întârziata, care limitează creșterea microorganismului. I.D.R. (+) la antigenul specific – *coccidioidina*, indică un prognostic bun (raspunsul imun mediat celular este eficient, limitând infectia). Boala se manifesta prin urmatoarele simptome: febra, astenie, anorexie, cefalee nocturna, modificari radiologice, leziunile pulmonare fiind asemanatoare cu cele din TBC.

Histoplasma capsulatum, este inclusa in Cls. *Fungi imperfecti*, cu multiplicare asexuata. Face parte din grupul fungilor dimorfi, cu o faza filamentoasa prezenta in sol si faza de drojdie in tesuturile infectate. Formează două tipuri de spori asexuati: *macroconidii* – tuberculiforme, cu perete celular gros si proiectii digitiforme, importante pentru identificarea de laborator si *microconidii* – mai mici, cu perete celular subtire, neted, care dacă sunt inhalati transmit infectia (fig. 50).

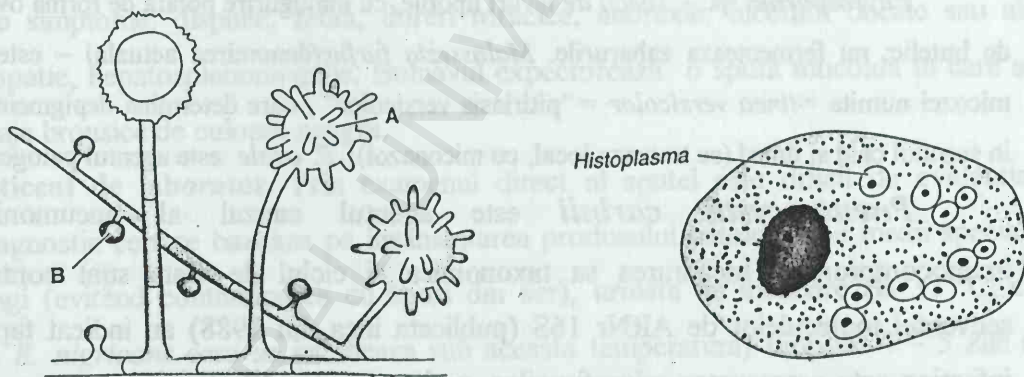


Fig. 50. A, B, C. Stadii de existenta ale speciei *Histoplasma capsulatum* : A si B - spori asexuati: macroconidii tuberculiforme (A) si microconidii (B); C- stadiul levuriform – celule localizate intr-un macrofag.

Transmitere. Sunt fungi raspânditi in multe parti ale lumii, in sol, zona endemica fiind situata in estul S.U.A. Agentul patogen este prezent mai ales in solul puternic contaminat cu excremente de pasari sau lilieci (guano) infectate. Numarul de infectii la om crește când se fac excavatii (pentru constructii) ale solului contaminat.

Patogenie. Sporii inhalati sunt fagocitati de catre macrofage si evoluează la forma de drojdie. Se raspândesc repede in corp, mai ales in ficat si splina, dar majoritatea infectiilor sunt asimptomatice. La o expunere intensa (cotete de pasari, pesteri cu lilieci) pneumonia devine manifesta. Forme de histoplasmoza diseminata severa apar la copii si indivizi cu imunitate celulara redusa, iar ulceratiile limbii sunt tipice pentru histoplasmoza diseminata la pacientii cu SIDA.

Diagnosticul de laborator. In biopsiile de maduva osoasa pot fi observate celule de drojdii in macrofage. Cultivarea pe mediu Sabouraud permite observarea de hife cu macroconidii. Diagnosticul histoplasmozei se mai poate face prin radioimunodozare (RIA), metode genetice si metode serologice: reactia de fixare a complementului RFC (titru semnificativ 1/32), imunodifuzie (metoda mai specifica, dar mai putin sensibila). Rezultatul acestor teste poate fi fals (+), datorita reactiilor imunologice incrucisate cu *Blastomyces* sp. Deoarece testele de evidentiere a anticorpilor pot fi negative, evidentierea antigenelor specifice in urina este un test util diagnosticarii histoplasmozei diseminate la pacientii imunocompromisi. Intradermoreactia (I.D.R.) pozitiva cu histoplasmina se caracterizeaza printr-o induratie cu $\phi = 5\text{mm}$, la 2-3 saptamâni dupa infectie. Reactia ramâne pozitiva ani de zile. Testul este util mai mult studiilor epidemiologice si mai putin diagnosticului. Infectiile asimptomatice nu se trateaza. Leziunile pulmonare se trateaza cu amfotericina B, iar formele meningeale cu fluconazol. Prevenirea se face doar prin evitarea expunerii.

Pityrosporum sp. – specii de levuri lipofile, cu inmugurire polara de forma ovala sau de butelie; nu fermenteaza zaharurile. *Malassezia furfur* (denumirea actuala) – este agentul patogen al micozei numita = *tinea versicolor* = “pitiriasis versicolor”, care determina depigmentarea pielii, mai ales in sezonul cald si umed (se trateaza local, cu miconazol); *P. ovale* este agentul patogen al matretei.

Pneumocystis carinii este agentul cauzal al pneumoniei, la pacientii imunocompromisi. Incadrarea sa taxonomica si ciclul de viata sunt controversate. Analiza secventei moleculelor de ARNr 16S (publicata inca din 1988) au indicat faptul ca acest agent infectios este asemanator microfungilor, mai exact drojdiei *Saccharomyces cerevisiae*. Analiza ulterioara a moleculelor de ADN mitochondrial si a diferitelor enzime sprijina ideea ca acest microorganism apartine fungilor. Totusi, din punct de vedere medical, este considerat înca protozoar. Faptul ca nu creste pe medii speciale pentru fungi si nu este sensibil la antibiotice antifungice, a întârziat acceptarea clasificarii sale in regnul fungilor.

Se transmite prin inhalare si determina infectii pulmonare, fara a invada tesutul pulmonar. Nu se transmite de la persoana la persoana. Prezenta chistilor in alveolele pulmonare induce un raspuns inflamator care determina acumularea unui exudat care blocheaza oxigenarea sângelui. Infectia se produce când mecanismele de aparare ale gazdei, de exemplu când numarul de limfocite Th, sunt reduse. Aceasta explica numarul mare de cazuri de pneumonie cu *P. carinii* la pacientii cu SIDA sau la copiii prematuri sau debili. *P. carinii* are o larga distributie in natura ; astfel, este prezent la animale (cai, oi, rozatoare), ca si la 70% dintre oameni, la care infectii le sunt asimptomatice (purtatori). Simptome: febra, tuse, dispnee, tahipnee. Infectiile netratate au o

mortalitate de 100 %. In cazul celor tratate, supravietuirea este de 50 % la primul episod. In stadiile terminale ale bolii SIDA se produc si infectii extrapulmonare (ficat, splina, ganglioni limfatici, maduva osoasa).

B. Caractere generale si diagnosticul de laborator al infectiilor determinate de microfungi filamentosi (mucegaiuri)

Microfungii filamentosi sunt microorganisme eucariote a caror forma de existenta vegetativa este reprezentata de un miceliu, format din filamente numite hife, care pot fi septate, sau neseptate, caracter care diferentiaza fungii superiori, de cei inferiori. Au o existenta saprotrufa, dar se comporta si ca microorganisme conditionat-patogene, determinând in general boli secundare (micoze) la indivizi debilitati de boli primare severe cum ar fi TBC-ul, diabetul, leucemiile. Sporii sunt alergeni pentru om.

Cls. *Phycomycetes*. *Mucor sp.* si *Rhizopus nigricans* produc micoze pulmonare si complicatii de tipul localizarilor secundare, cerebrale si sinusale. Aceste infectii se caracterizeaza prin urmatoarele simptome: dispnee, febra, dureri toracice, anorexie, ulceratii bucale sau ale limbii, limfadenopatie, hepatosplenomegalie. Bolnavul expectoreaza o sputa mucoida in care se pot observa mulaje bronsice de culoare neagra.

Diagnosticul de laborator. Prin examenul direct al sputei este dificil de evidentiat ciuperca. Un diagnostic cert se bazeaza pe insamântarea produsului patologic pe medii speciale pentru microfungi (evitând contaminarea cu spori din aer), urmata de incubare (la 37 °C, cu exceptia speciei *R. nigricans* care se incubeaza sub aceasta temperatura) timp de 4 – 5 zile si observarea coloniilor. Din coloniile izolate se fac preparate proaspete L/ 1 care se observa microscopic pentru evidentierea sporangioforilor (fig. 51). Se face un test de patogenitate, prin inocularea unei suspensii realizate dintr-o colonie izolata, la animale. Dupa 3 saptamâni se sacrifica si pot fi observate microabcese in rinichi, ficat, si ganglioni limfatici, iar in lichidele extracelulare pot fi evidentiata la microscop filamente miceliene. Este important diagnosticul diferential fata de TBC (cu care poate coexista), aspergiloza pulmonara, pneumonii, abcese, tumori benigne sau maligne si alte afectiuni pulmonare.

Se trateaza cu amfotericina B (tratamente de lunga durata 4 – 8 saptamâni), timp in care se recomanda intreruperea tratamentului cu corticosteroizi, care favorizeaza generalizarea, se trateaza boala primara (TBC, diabet) si se sustine rezistenta generala a organismului (alimentatie, vitamine, odihna). In mucormicozele bine localizate se fac interventii chirurgicale, sub protectie de antibiotice.

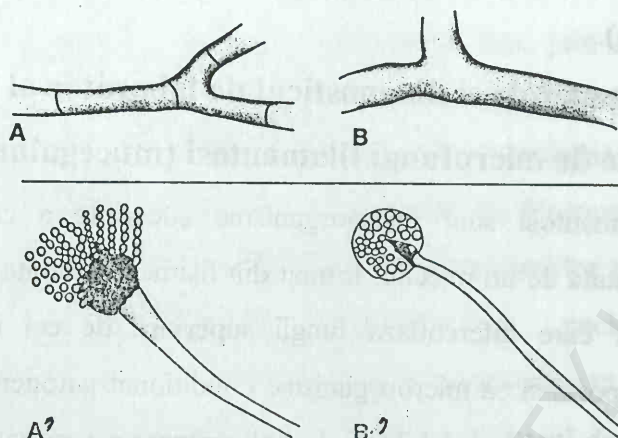


Fig. 51, A si B. Hife de *Aspergillus sp.* si *Mucor sp.* in tesuturi. A. *Aspergillus sp.* prezinta hife septate, cu ramificatii in forma literei V; B. *Mucor sp.* prezinta hife neseptate, ramificate in unghi drept. A' si B'. *Aspergillus sp.* si *Mucor sp.* in cultura. A'. Conidiofor de *Aspergillus sp.*, in forma de perie, cu spori exogeni, in siruri radiare; B'. Sporangiofor de *Mucor sp.*, cu spori endogeni formati intr-un sporangiu.

Cls. *Ascomycetes*. In aceasta clasa este inclus grupul *fungilor dermatofiti*, numiti astfel deoarece determina infectii ale pielii denumite generic dermatomicoze sau dermatofitii. Acesti microfungi au afinitate pentru tesutul cornos si pot determina liza acestuia, fiind deci *keratofile* si *keratolitice*. In tesutul cornos, la nivelul pielii acoperite cu par sau glabre (mai ales la pliuri), sunt prezente hife si artrospori.

Infectiile pot fi superficiale, cu frecventa cea mai mare, subcutanate si infectii dobândite pe cale respiratorie, dar cu manifestari cutanate. Speciile de fungi dermatofiti cele mai frecvent izolate in clinica apartin genurilor: *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum*. Dermatofitii sunt diseminati in natura prin artrospori. Dupa sursa primara de infectie, care poate fi reprezentata de animale, om, sol, speciile dermatofite sunt denumite *zoofile*, *antropofile* si *geofile*. In zonele temperate, *Trichophyton verrucosum* (gazda primara - bovine) si *Microsporum canis* (gazda primara - câini, pisici) sunt cei mai comuni agenti fungici zoofili ai infectiilor umane. Specia geofila *Microsporum gypseum* este un agent patogen neobisnuit al infectiilor umane, dar este prezent la indivizii expusi, gradinari si agricultori. Dermatofitii antropofili sunt agentii cauzali cei mai comuni ai infectiilor cutanate.

Speciile dermatofite difera prin distributia geografica si prin predilectia pentru anumite situsuri din organism. Dermatofitii sunt keratofile si invadeaza structurile keratinizate ale corpului: pielea, parul si unghiile. Infectiile se produc ca urmare a contactului cu artrosporii sau

cu hifele cu perete celular mai subtile, care se formeaza in gazde (prin germinarea sporilor) si care sunt prezente in scuame si par, in care pot supravietui timp de luni de zile. Termenul latinesc *tinea*, care inseamna molie sau vierme, este folosit pentru infectiile dermatofile, deoarece initial acestea erau considerate a fi determinate de un parazit asemanator unui vierme. “Tinea capitis” afecteaza parul si pielea capului, “tinea corporis” afecteaza corpul, iar “tinea pedis” afecteaza picioarele. Leziunea tipica pentru infectiile dermatofile este o leziune circulara, cu margini ridicate. Principalul simptom este gratajul (scarpinatul), in diferite grade. Pielea este adesea uscata si uneori crapata (mai ales cea interdigitala); infectiile parului pot determina pierderea lui. Intensitatea inflamatiei asociate variaza dupa specie, fiind de obicei mai mare in cazul speciilor zoofile, comparativ cu cele antropofile.

Dermatofitiile sunt boili contagioase prin contact direct, care se diferentiaza in functie de localizare in :

- 1) dermatofitii ale pielii acoperite cu par: microsporii, trichofitii, favus, kerion;
- 2) dermatofitii ale pielii glabre: herpes circinat, sycosis;
- 3) dermatofitii ale pielii pliate: piciorul atletului, eczema marginala de Hebra;
- 4) dermatofitii ale fanerelor: onixis, perionixis.

1) **Microsporiile** determina zone de alopecie (de pierdere a parului) rotunde, mari si rare.

Trichofitiile determina aparitia de zone de alopecie, neregulate, mici si numeroase.

Favus – elementul caracteristic este godeul favic localizat la baza firului de par, care lasa cicatrici permanente.

Kerion – inflamatia puternica este urmata de caderea brusca si masiva a parului.

2) **Sycosis** – este echivalentul kerionului, pe pielea glabra.

Herpesul circinat se caracterizeaza prin aparitia de papule eritemo-scuamoase, care cresc in cercuri concentrice, la marginea carora se observa vezicule.

3) **Piciorul atletului** se poate prezenta sub doua forme: a) o forma acuta, manifestata prin vezicule mici pruriginoase, pe pielea plantei si in zona interdigitala; b) o forma cronica, manifestata prin uscarea tegumentelor si aparitia de fisuri interdigitale si plantare insotite de prurit si miros dezagreabil.

Eczema marginala de Hebra determina placarde eritemo-scuamoase in zona inghinala.

4) **Onixis si perionixis** sunt infectii localizate la baza si in jurul unghiilor. Leziunile caracteristice determina decolorarea bazei unghiei si caderea consecutiva a acesteia.

Speiile de dermatofiti difera si prin capacitatea lor de a declansa un raspuns imun: anumite specii (*Trichophyton rubrum*) determina infectii cronice sau recaderi, in timp ce alte

specii induc o rezistentă pe termen lung la reinfectie. La anumiți bolnavi, antigenele fungice circulante determină o reacție de hipersensibilitate a pielii (eritem sau vezicule). Când pielea devine crapată și degradată ca rezultat al infecției, devine sensibilă la suprainfecție, mai ales cu bacterii Gram negative. Foarte rar, fungii dermatofiti invadează țesutul subcutanat pe calea vaselor limfatice și determină apariția de granuloame și edeme. Diseminările în ficat, creier, pot fi fatale.

Diagnosticul de laborator se bazează în mare măsură pe cultivarea pe mediu Sabouraud a produsului patologic (scuame, țesut de inflamație din leziuni). Majoritatea speciilor de *Microsporum* formează artrospori mici, în lanțuri, pe suprafața firului de păr (*endothrix*), în timp ce speciile de *Trichophyton* aparțin atât grupului *endothrix*, cât și grupului *ectothrix*, cu artrospori mari și răspândiți neuniform în interiorul firului de păr. Confirmarea identificării depinde de caracterele de colonie și microscopice ale fungilor cultivați pe mediu Sabouraud. Creșterea lor este relativ lentă (~ 2 săptămâni), metoda cultivării fiind utilă mai ales pentru determinarea sursei de infecție.

În infecțiile dermatofite tratamentul este mai ales topic (local). Totuși, în infecțiile parului și unghiilor sunt mai recomandate antifungicele orale (miconazol). Pentru infecțiile unghiilor se recomandă griseofulvin pe cale bucală și aplicarea locală de agenți keratolitici (mixture de acid salicilic și benzoic). Tratamentele sunt de lungă durată (infecții ale scalpului – 6 – 12 săptămâni, infecții ale unghiilor de la mâini – 6 luni și ale unghiilor de la picioare – 12 luni).

Aspergillus fumigatus, care este prezent pe frunze uscate, în praf, produce aspergiloze (aspergiloza traheobronșică și pulmonară, aspergilomul pulmonar, otomicoza aspergilară, endocardita aspergilară și septicemii). Simptomele acestor infecții sunt asemănătoare cu cele ale tuberculozei: tuse, expectorație mucoidă sau mucopurulentă, striatii sanguinolente, hemoptizii, febră, pierdere în greutate, oboseală, transpirații nocturne, stare generală alterată. Formele traheobronșice se manifestă prin dureri presternale, febră mică, tuse cu expectorație mucoidă în care pot fi evidențiate elemente miceliene și spori. Formele bronhopulmonare se înregistrează mai ales la bărbați, adesea unilateral și debutează acut, prin febră mare, dispnee, tuse cu expectorație mucopurulentă, hemoptizii (eliminarea de sânge din țesutul pulmonar), stare generală alterată. Aceste infecții pot evolua spre diseminări pe cale hematogenă și septicemie.

Aspergiloza bronhopulmonară alergică se manifestă prin simptome asemănătoare cu cele ale astmului bronhopulmonar și un titru mare de IgE cu specificitate față de antigene ale genului *Aspergillus*. În expectorația bolnavilor care are forma unor dopuri (mulaje bronșice) se evidențiază hife. Astmul, cauzat de inhalarea de conidii, este prezent mai ales la persoane cu ocupații predispozante (agricultura).

Diagnosticul de laborator. In probele bioptice se evidentiaza hife septate, ramificate care invadeaza tesuturile. In culturi pe mediu Sabouraud se observa la lupa binocular colonii cu lanturi radiare de conidii. Culturile sunt foarte infectioase, astfel ca sunt necesare masuri de evitare a inhalarii sporilor. Evidentierea antigenului *galactomanan* in ser se face la pacienti cu aspergiloze invazive. Reactia de latex aglutinare (pe placa cu godeuri cu fond negru tip Pastorex).

Specia *Penicillium sp.* are conidiofori in forma de « pensula » (fig. 52) si este raspunzatoare, de penicilioze viscerele, mai ales pulmonare cu manifestari similare aspergilozelor.

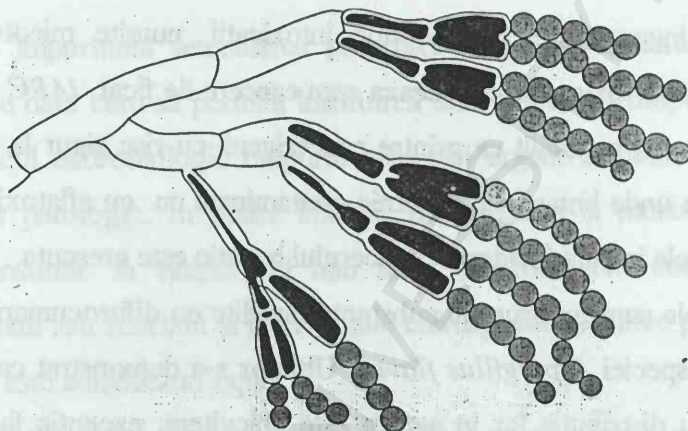


Fig. 52. Conidiofor de *Penicillium sp.* (schema).

Micotoxicoze

Unele specii de mucegaiuri produc *micotoxine* puternice, dintre care unele chiar cu proprietati cancerigene. Intre acestea se numara:

- *aflatoxinele*, produse de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, specii prezente pe semintele de porumb, alune, nuci, cafea (in general pe semintele de oleaginoase), ca si in produsele lactate.

- *ochratoxina (A, B, C)* – produsa de specii de *Aspergillus* si *Penicillium*, in zonele cu climat rece (Europa de Nord si Canada), iar de specia *Aspergillus ochraceus*, numai in zonele tropicale si subtropicale. Ochratoxina A este cea mai toxica si se gaseste in cereale mucegaite, fasole si arahide ;

- *patulina*- produsa de *Aspergillus clavatus*, *Penicillium patulum*, *Penicillium claviforme*, *P. expansum*, *P. verucosum* (pe mere, in cidru) ;

- *acidul penicilic*, produs de *Penicillium cyclopium* (pe porumb, fasole, orz).

Spre deosebire de exotoxinele bacteriene, cu foarte rare exceptii, micotoxinele nu pot fi inactivate prin caldura. Aflatoxinele se produc la 30°C - temperatura optima de dezvoltare a

mucegaiurilor. S-a dovedit experimental efectul cancerigen al aflatoxinelor produse de specia *A. flavus* (afla-toxine). Este posibil sa aiba acelasi efect si la om. Se pare ca pe lânga efectul direct, aflatoxinele ar avea si un efec imunosupresor. Este dificil de afirmat ca o anumita forma de cancer se datoreaza exclusiv toxinelor fungice; efectul substantelor cancerigene insa, se insumeaza (teoria cauzalitatii multiple).

Desi mucegaiurile se dezvoltă la suprafața produselor alimentare, micotoxinele difuzează în profunzimea acestora, astfel îndepărtarea stratului superficial care conține miceliul, nu înalță riscul ingerării de micotoxine. Majoritatea micotoxinelor nu determină îmbolnăviri acute, dar prin ingerare repetată produc intoxicații, numite micotoxicoze. Acestea se pot manifesta ca hepatite toxice sau evoluează spre cancere de ficat. IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a stabilit ca printre cancerigenii cu risc sigur la om se află și aflatoxinele. Zonele geografice unde hrana este puternic contaminată cu aflatoxine (zone calde și umede), corespund cu zonele în care incidența cancerului hepatic este crescută.

Aflatoxinele sunt un grup de substanțe înrudite cu difurocumarinele, izolate pentru prima dată din celulele speciei *Aspergillus flavus*. Ulterior s-a demonstrat că și alte specii de mucegai produc aflatoxine; distribuția lor în natură este ubicvită, excepție făcând zonele cu climă mai rece, cum ar fi nordul Europei și Canada. Cele mai multe lucrări privind contaminarea cu aflatoxine se referă la arahide, făina de arahide, dar s-au pus în evidență și în cereale - grâu, ovăz, porumb, semințe oleaginoase (soia), ca și în brânzeturile fermentate care nu sunt pastrate în condiții de temperatură și umiditate corespunzătoare.

Aflatoxinele sunt cancerigene la soarece, sobolan, pește, rată și maimuță, administrate pe mai multe căi, inclusiv calea orală și induc în special cancer hepatic, de colon și rinichi. La om există o corelație pozitivă între media concentrației aflatoxinelor din alimentația populației și incidența cancerului hepatic primar. Nu există însă date prin studii de caz (individuale), privind valoarea ingerării cronice de aflatoxine și efectul cancerigen la om. Totuși, ținând cont de efectul cancerigen puternic asupra multor specii de animale, precum și de distribuția geografică a cancerului primar hepatic, care se corelează cu expunerea populației la aceste micotoxine, se poate afirma că și omul este sensibil la efectul cancerigen al aflatoxinelor, care se situează cu o probabilitate mare printre factorii de risc în procesul de carcinogeneză, în monografia (în 20 de volume - 1979) elaborată de Agenția Internațională de Cercetare a Cancerului - IARC.

PRINCIPII DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIC

- considerații generale

O preocupare importantă a microbiologilor este stabilirea unui diagnostic microbiologic corect, imaginarea unor teste de laborator necesare acestuia, ca și studiilor de epidemiologie (care se ocupă cu monitorizarea incidenței bolilor infecțioase, a transmiterii acestora în colectivități și cu elaborarea măsurilor necesare profilaxiei acestor boli). Pe de altă parte, clinicienii așteaptă de la microbiologi identificarea agenților patogeni, testarea sensibilității tulpinilor microbiene la antibiotice și o raportare rapidă a rezultatelor care să furnizeze informații relevante necesare deciziilor medicale.

În general, este importantă semnalarea prezenței unei infecții, determinarea naturii sale specifice și furnizarea de date care să permită instituirea unui tratament timpuriu. Pentru stabilirea tratamentului, diagnosticul microbiologic timpuriu este mai urgent în bolile infecțioase, decât în orice alt tip de proces patologic. În multe infecții, morbiditatea și mortalitatea pot fi reduse semnificativ dacă se instituie în timpul cel mai scurt un tratament corect; în alte infecții, spitalizarea poate fi evitată sau scurtată și intervențiile chirurgicale specifice pot fi evitate, dacă un tratament antimicrobian este administrat rapid.

Cuantificarea rezultatelor. Acest concept nu a fost cu adevărat evaluat în microbiologie, decât în cazul uroculturilor, deși poate fi folosit și în alte situații. De exemplu, poate ajuta la: 1) diferențierea unui microorganism prezent ca un “contaminant”, de unul implicat activ în infecție; 2) determinarea importanței relative a diferitelor microorganisme în infecțiile mixte. În mod obișnuit, cuantificarea uzuală prin metoda diluțiilor sau prin metoda ansei calibrate nu este necesară. Numărul microorganismelor prezente poate fi apreciat cu “creștere abundentă”, “creștere moderată” sau “creștere săracă”, pe baza colorației Gram și a creșterii constatate pe o placă cu mediu de izolare (de ex., colonii extinse pe grupul 2 de striuri, pe grupul 3 etc.). Colorația Gram este importantă datorită diferențelor în biologia, sensibilitatea față de agenți antimicrobieni, rata de creștere a bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, care pot fi corelate cu exigențele lor nutritive sporite (în cazul germenilor pretențioși).

Diferitele metode de diagnostic (clasice și moderne), de detectare și ulterior de identificare a agenților infecțioși, au grade de sensibilitate diferite, cu praguri diferite în ceea ce privește densitatea numerică inițială a bacteriilor în proba patologică (tabelul nr. 12). Printre disciplinele biologice care au realizat în ultimii ani progrese considerabile în materie de automatizare, bacteriologia medicală se număra printre cele care au așteptat cel mai mult progresul tehnic.

Tabel nr. 12. Principalele tipuri de metode de detectare a bacteriilor in probele patologice, in functie de densitatea numerica a bacteriilor, care ilustreaza si gradul de sensibilitate a metodelor.

Bacterii - Densitate numerica/ greutate	Metoda	Pragul de detectare
10^6 - 1 ng		
10^5 - 0,1 ng	Microscopie Serologie	$> 10^5$ - 10^6 bacterii
10^4 - 0,01 ng		$> 10^5$ bacterii - 0,1ng
10^3 - 1pg	Sonde	$> 10^3$ - 10^5
10^2 - 0,1 pg		
10 - 0,01 pg	Sonde ramificate	$> 10^1$ - 10^3
1 - 1 fg	PCR / Cultura	> 1 - 10^2 bacterii

Prima etapa in evolutia tehnologica a bacteriologiei medicale a constat in disponibilitatea galeriilor miniaturizate, gata de a fi utilizate, cu caractere de identificare bine ordonate si usor de folosit, care au permis caracterizarea genurilor si speciilor si identificarea precisa si rapida a acestora. Desi metodele clasice ramân utile intr-un numar mare de cazuri, pentru bacteriile greu cultivabile, metodele moleculare cum ar fi amplificarea genica *in vitro* (prin tehnica *PCR*) si secventierea moleculelor de ARN 16 S, au permis progrese spectaculoase atât in cercetare, cât si in diagnosticul bacteriologic. De exemplu, in ultimul deceniu, prin astfel de metode au fost detectate si identificate bacterii patogene, anterior necunoscute: *Bartonella henselae*, *Tropheryma whippelii*. Automatizarea mai accentuata a tehnicilor moleculare este o necesitate care ar face aceasta tehnologie accesibila unui numar mai mare de laboratoare.

A doua etapa in evolutia tehnologica a constat in automatizarea tehnicilor de studiu a sensibilitatii la agenti antimicrobieni prin microdilutie in mediu lichid, ceea ce a permis sa se acceda la o simplificare metodologica si o exprimare parametrica a rezultatelor. Cuplarea tehnicilor de identificare, cu aceste sisteme de citire interpretativa a antibiogramelor usureaza munca si interpretarea rezultatelor de catre microbiologi. Totusi antibiograma realizata prin metoda difuzimetrica ramâne foarte utila pentru anumite genuri si specii bacteriene.

A treia etapa in evolutia tehnologica a constat in automatizarea unui examen, considerat pe drept cuvânt, ca cel mai important in domeniul bacteriologiei clinice, respectiv *hemocultura*, un

examen fundamental pentru diagnosticul bacteriemiei si septicemiei. Infectiile grave, generalizate necesita un diagnostic rapid, pentru a institui rapid antibioterapia tinta si eficienta.

Metode de diagnostic :

- I. Diagnosticul microbiologic (direct)**
- II. Diagnostic imunologic (indirect)**
- III. Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.**

I. Diagnosticul microbiologic (direct) necesita parcurgerea urmatoarelor etape(v. Anexa I):

- 1. Prelevarea si transportul produselor patologice;**
 - 2. Examenul direct al produselor : microscopic si microscopic (preparat L/I);**
 - 3. Izolarea in cultura pura a agentului patogen incriminat in etiologia unei infectii (prin insamantare pe un mediu de cultura adecvat - medii de cultura uzuale, selective sau de imbogatire);**
 - 4. Identificarea agentului patogen se face in mai multe etape (vezi Anexa I), dupa insamantarea pe medii de cultura speciale si examinarea urmatoarelor proprietati:**
 - **Caractere de cultura si de colonie** (dupa insamantarea pe diferite medii lichide si solide);
 - Examenul microscopic permite determinarea **tipului morfologic** (fig. 53) si a **afinitatilor tinctoriale** (dupa efectuarea de frotiuri colorate prin metoda Gram (fig. 54) si prin metode selective (pentru evidentiarea sporilor, capsulei, incluziilor);
 - **Caractere biochimice (metabolice);** studiul acestor caractere permite determinarea biotipului si o identificare destul de precisa, deoarece proprietatile biochimice sunt expresia unor determinanti genetici cromozomali stabili;
 - **Caractere biochimice (metabolice);** dintre toate posibilitatile de tipizare si identificare taxonomica, **biotipizarea** este accesibila majoritatii laboratoarelor si in acelasi timp mult utilizata deoarece proprietatile biochimice ale bacteriilor sunt determinate de determinanti genetici cromozomali, astfel ca sunt mai stabile decât alte caractere determinate de determinanti genetici plasmidiali; biotipizarea poate fi realizata cu ajutorul testelor biochimice care au inregistrat o evolutie in timp, de la imaginarea lor si pâna in prezent:
- **Teste individuale**, numite azi conventionale sau de referinta; se efectueaza individual (un test – un tub / o placa) si in macrovolume (fig. 56 A, B, D);
 - **Sisteme de identificare biochimica multitest**, care utilizeaza medii speciale in volume mici (tuburi de hemoliza) si care permit efectuarea si interpretarea mai

multor teste biochimice in acelasi tub. Medii multitest mult utilizate in clinica, pentru identificarea enterobacteriilor, sunt: TSI, MILF si MIU.

- **Sisteme microtest** care se efectueaza in microvolume si care asociaza un numar mare de teste in aceeasi placa/tub si care sunt de regula suficiente pentru a realiza o identificare precisa. Multe dintre sistemele microtest au fost imaginate initial pentru identificarea membrilor familiei *Enterobacteriaceae*; unele dintre speciile si tulpinile de enterobacterii determina imbolnaviri grave, al caror diagnostic se impune sa se faca cu rapiditate si precizie. Exemple de sisteme microtest pentru identificarea enterobacteriilor: *API 20E*, *Enterotube II*, *Micro-ID*, *MicroScan*.

Sistemul *API* reprezinta un sistem de identificare produs de firma *BioMérieux* -Lyon, Franta, in numeroase variante pentru diferite grupe de microorganisme: *API 20E* (pentru enterobacterii si alti bacili Gram negativi), *API 20 NE* (pentru bacili Gram negativi non-enterici), *API Staph*, *API Strep*, *API Candida* etc. Acest sistem permite identificarea unui numar mare de specii bacteriene in 18 - 24 ore in general (varianta *RapiD 20E* permite identificarea in 4 ore) fara a necesita determinarea unor caracteristici fiziologice suplimentare. Sistemul *API 20E* este considerat unul dintre cele mai performante sisteme de identificare a enterobacteriilor fiind o versiune miniaturizata a procedurilor conventionale pentru identificarea enterobacteriilor si a altor bacterii Gram negative. Etapele de lucru cu acest sistem sunt ilustrate in fig. (). Sistemul este insotit de un catalog de identificare; exista in prezent si un program computerizat (*API Lab Plus*). Studiile realizate pe tulpini izolate din mediul spitalicesc au aratat ca *API 20E* este unul dintre cele mai complete sisteme comerciale de identificare a enterobacteriilor fiind usor de citit si interpretat, permitând comparatia valida a rezultatelor din diferite laboratoare ale lumii.

- Caractere de patogenitate si virulenta:

*** factorii de virulenta nu sunt studiatii in clinica in general, ci in cercetare, totusi anumiti factori sunt foarte utili identificarii unui agent patogen, cum ar fi: proprietatile hemolitice si tipul de hemoliza in cazul streptococilor, coagulaza in cazul stafilococilor;**

- evidentierea proprietatilor hemolitice, citolitice, a proprietatilor de aderenta si invazie a unui substrat celular sensibil (culturi *in vitro* de celule normale diploide sau linii celulare stabilizate), a capacitatii de a sintetiza enzime (agresine) si toxine (v. fig. 31 - 33); pentru confirmarea testelor *in vitro* este necesar apoi studiul *in vivo* al proprietatilor de patogenitate si virulenta (capacitatea de a initia o infectie la animale sensibile de laborator, agresivitatea si toxigeneza), ca si al imunogenitatii agentilor patogeni si raspunsului imun al gazdei;

- **Sensibilitatea/rezistenta** la anumite substante antibiotice si chemoterapeutice (proprietati determinate de determinanti genetici cromozomali stabili, utile identificarii anumitor specii - de ex., testul sensibilitatii la optochin util in identificarea *Str. pneumoniae*, sensibilitatea la bacitracina si rezistenta la SXT a streptococilor β -hemolitici, serogrupul A, pe când cei serogrupurile C,F,G sunt rezistenti la bacitracina si sensibili la STX).

- Interpretarea rezultatelor si identificarea agentului infectios.

* **Sisteme de identificare a microorganismelor** - Identificarea tulpinilor bacteriene se poate face cu ajutorul unor sisteme de identificare de tipul :

A. Chei dichotomice

B. Tabele de identificare (sisteme politetice)

C. Programe de identificare asistata de calculator

- A. **Cheile dichotomice** pentru identificarea prezumtiva a microorganismelor sunt de acelasi tip cu cele utilizate pentru identificarea macroorganismelor, reprezentând sisteme secventiale in cadrul carora identificarea se face pas cu pas, inaintând progresiv de-a lungul a mai multor cai ramificate. Alegerea unei cai sau a alteia depinde de caracterele macroscopice sau microscopice observate sau rezultatele pozitive sau negative ale testelor biochimice efectuate. Prezinta dezavantajul ca, in cazul aprecierii incorecte a unui caracter, se porneste pe o cale gresita a cheii de identificare, care conduce la un diagnostic fals.
- B. **Tabelele sau schemele de identificare politetice** listeaza caractere importante pentru identificarea unui grup de bacterii si caracterele specifice speciilor de bacterii din grupul respectiv, frecvent izolate in clinica, de ex. stafilococi, enterobacterii. Prezinta avantajul ca fiecarui caracter i se acorda o valoare egala pentru identificare si, in acelasi timp, pentru fiecare specie este prezentat si procentul de tulpini pozitive pentru fiecare caracter semnificativ.
- C. **Programele de identificare asistata de calculator** au o baza de date mare, care permite identificarea corecta si calcularea gradului de asemanare a tulpinii de identificat cu tulpini de referinta ale aceleiasi specii bacteriene, semnalând si caracterele atipice ale tulpinii de identificat; calculeaza scorul de identificare si in cazul când acesta nu este maxim (99,9%), sugereaza teste suplimentare care ar putea imbunatati scorul si ar creste sansele de identificare finala; sugereaza si alti taxoni posibili. Exemple de programe de identificare: *P.I.B. (Probabilistic Identification of Bacteria)*, *BACT.ID. (Bacterial identification)*, *API Lab Plus (BioMérieux)*.

5. **Determinarea spectrului de sensibilitate la antibiotice (a antibiotipului)** tulpinii bacteriene izolate, prin metoda antibiogramei – necesara in cazul unor genuri si specii supuse fenomenului de dobândire a rezistentei (stafilococi, enterococi, *Str. pneumoniae*, enterobacterii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus sp.*, *Neisseria gonorrhoeae* s.a.).

6. **Serotipizarea agentului patogen prin reactii serologice**, permite caracterizarea din punct de vedere antigenic a tulpinii bacteriene izolate: etapa necesara in cazul unor specii supuse fenomenului de variatie antigenica: *E. coli*, *Salmonella sp.*; serotipizarea poate fi utila studiilor epidemiologice.

7. **Tipizarea cu ajutorul fagilor (lizotipie)**, metoda aplicata mai ales in studiile epidemiologice. Reprezintă determinarea spectrului de sensibilitate al unor tulpini bacteriene (*S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *V. cholerae*, *C. diphtheriae* etc.) față de un set de preparate fagice și se bazează pe faptul ca celulele bacteriene aparținând aceleiași tulpini sunt sensibile la aceleași preparate fagice.

In continuare, sunt prezentate anumite detalii metodologice referitoare la etapele identificării.

I. Diagnosticul microbiologic (direct) -

1. Prelevarea si transportul produselor patologice - Recomandari generale

- Recoltarea de probe corespunzatoare (de ex. sânge si lichid cefalorahidian in cazul unei suspiciuni de meningita);
- Recoltarea probei trebuie sa se faca la momentul potrivit, in timpul fazei acute a bolii;
- Daca este posibil, proba trebuie recoltata inainte de inceperea tratamentului cu substante antimicrobiene;
- Colectarea unei cantitati suficiente de produs biologic si un numar adecvat de probe (de ex. o cantitate suficienta de sânge/ser pentru mai mult de un set de determinari);
- Evitarea contaminarii produsului prin:
 - microbiota normala (de ex. urina se recolteaza din jetul mijlociu);
 - echipament nesteril;
- Utilizarea unor containere potrivite si medii de transport corespunzatoare;
- Etichetarea corecta a probelor;
- Completarea formularului de ancheta cu informatii clinice si o posibila etiologie;
- Stabilirea legaturii cu laboratorul si informarea acestuia de eventuale teste necesare;
- Transportul probelor biologice la laborator in timpul cel mai scurt, perioada in care trebuie mentinute conditiile necesare mentinerii viabilitatii agentilor patogeni eventual prezenti in probe; aceste conditii se refera la:
 - Temperatura – care trebuie sa fie optima pentru supravietuirea tipului de germeni banuiti; de ex. speciile de *Neisseria* sunt sensibile la temperaturi scazute, temperatura optima de transport a probelor suspecte fiind de 37°C, in timp ce pentru produsele polimicrobiene, temperatura optima de transport este de 4°C, evitându-se multiplicarea germenilor asociati, prezenti in mod normal in produsul biologic respectiv;
 - Timpul de supravietuire al agentilor patogeni in probe, pâna la prelucrarea acestora in laborator; timpul maxim este in medie de 6 ore, dar poate fi prelungit prin utilizarea mediilor de transport sau de conservare, care contin in acelasi timp si factori inhibitori ai multiplicarii microorganismelor asociate (ex. mediu Stuart);
 - Potentialul redox al mediului si conditia de anaerobioza, necesara transportului bacteriilor anaerobe, asigurata in recipiente cu azot sau dioxid de carbon sau cu un agent reductor; seringă de recoltare a probelor (sânge sau lichid de inflamatie a tesuturilor afectate) nu trebuie sa contina aer, iar acul trebuie sa fie infipt intr-un dop de cauciuc inainte de recoltare.

Conditii particulare de recoltare si transport ale principalelor produse biologice recoltate in cazul bolilor infectioase

Exudatul nasofaringian – se recolteaza in infectii ale cailor respiratorii; recoltarea se face cu tampon de vata steril, dimineata, pe nemâncate, inainte de periajul dintilor; recoltarea se face prin miscari circulare pe suprafata amigdalelor si a peretelui posterior al faringelui. Se evita atingerea limbii. Perioada pâna la prelucrarea in laborator a probelor nu trebuie sa depaseasca 2h, când acestea sunt pastrate la temperatura camerei sau maximum 4 h la 4°C.

Sputa – se recolteaza in infectii bronho-pulmonare; recoltarea se face in placi Petri sau recipiente cu gât larg sterile, din expectoratie consecutiva unui acces de tuse; se analizeaza portiunile mucoide, eventual sanguinolente.

Puroiul, materialul vâscos care contine leucocite intregi sau degradate, celule ale tesutului afectat, fibrile de fibrina si corpi microbieni, se recolteaza cu ajutorul seringii din cavitati inchise si cu ansa, tampon sau pipete Pasteur din leziuni deschise. Perioada de transport a probelor nu trebuie sa depaseasca 2h la temperatura camerei sau 4 h la 4°C.

Secretiile mucopurulente de pe mucoase si tegumente se recolteaza cu tampoane, ace sau pipeta Pasteur sterile si se transporta rapid la laborator ;

Sângele se recolteaza pentru examenul numit *hemocultura*, considerat cel mai important examen din bacteriologia clinica, deoarece este fundamental pentru stabilirea diagnosticului de bacteriemie si septicemie, forme grave ale bolilor infectioase care necesita un diagnostic rapid si instituirea tratamentului ;

- recoltarea se face, dupa aplicarea locala a unui antiseptic (tinctura de iod), din vena brahiala la adult si din vena jugulara la copil, direct in flacoanele cu mediu de cultura (unul pentru germeni aerobi si unul pentru anaerobi); se recomanda respectarea proportiei sânge /mediu de cultura (1 volum sânge/ 10 volume mediu).

Urina - in mod normal este sterila, cu exceptia ultimei portiuni a uretrei;

- recoltarea se face, dupa o prealabila toaleta a zonei urinare (spalare cu apa si sapun), din jetul mijlociu de urina, pentru examenul numit *urocultura*, care poate fi calitativa si cantitativa (insamantari din dilutii zecimale de proba, in striuri - cu ansa calibrata sau cu pipeta si dispersia inoculului, pe geloza simpla, geloza sânge si pe mediu selectiv Mac Conkey sau AABT) sau cu ajutorul unor teste rapide de tipul « Dip Streak »).

Secretia uretrala se recolteaza cu ajutorul ansei sau cu tamponul steril si se transporta rapid la laborator gonococul (*Neisseria gonorrhoeae*) fiind sensibil sub 37°C.

Materiile fecale eliminate spontan (in infectii digestive acute) sau dupa purgative saline, se recolteaza in coprorecoltoare cu mediu de transport si conservare a viabilitatii germenilor (Stuart sau Cary-Blair); se selecteaza pentru analiza bacteriologica a acestui produs numita *coprocultura*, portiunile care prezinta mucozitati, puroi, striuri sanguinolente si din mai multe zone.

Lichidul cefalorahidian, lichidul pleural se recolteaza in meningite, afectiuni pleuro-pulmonare, prin punctie realizata de catre medicul specialist;

- insamântarea se face la patul bolnavului sau produsele se transporta rapid la laborator (*Neisseria meningitidis* = meningococul nu supravietuieste sub 37°C mai mult de 30’);

Alimentele se analizeaza in cazul unei suspiciuni de toxiinfectie alimentara; inainte de insamântare, alimentele lichide se omogenizeaza, iar cele solide se maruntesc si se mojareaza in apa fiziologica sterila.

Vomismentele se analizeaza in cazul unei suspiciuni de toxiinfectie alimentara.

Resturile alimentare lichide se omogenizeaza, iar cele solide se maruntesc si se mojarcaza in mod steril in apa fiziologica sterila; insamantarea se face la patul bolnavului sau produsul se transporta la laborator in maximum. 6 ore, la 4°C.

- **Produsele recoltate la necropsie** – se recomanda recoltarea lor in timpul cel mai scurt dupa deces si deschiderea doar in final a cavitatii abdominale, cu scopul evitarii contaminarii altor probe cu bacterii din microbiota intestinala; transportul se face la 4°C.

2. Examenul direct al produselor: macroscopic si microscopic (preparate L/I pt. evidentierea prezentei, ca si a mobilitatii microorganismelor din proba analizata);

3. Izolarea in cultura pura a agentului patogen incriminat in etiologia unei infectii (prin insamantare pe un mediu de cultura adecvat - medii de cultura uzuale, selective sau de imbogatire);

4. Identificarea agentului patogen

- se examineaza **caracterele de cultura si de colonie** (dupa insamantarea pe diferite medii de cultura, lichide si solide); se examineaza microscopic proprietatile morfologice ale germenilor dezvoltati pe mediu lichid pe preparate proaspete L/I (pentru evidentierea mobilitatii, caracter util identificarii);
- din culturile dezvoltate pe mediu lichid/solid se fac preparate fixe – frotiuri, care se examineaza la microscopul optic cu obiectivul de imersie si se determina **tipul morfologic** (fig. 53) si **afinitatile tinctoriale**; frotiurile se coloreaza prin metoda Gram, cu mare valoare pentru diagnosticul prezumtiv (fig. 54), ca si prin metode selective, daca este cazul (pentru evidentierea sporilor, capsulei, incluziilor - prezenta diferitelor structuri intra - si extraparietale fiind utile identificarii);
- studiul proprietatilor biochimice ale microorganismelor = **biotipizare** (exemple sunt prezentate in fig. 55, 56); toate caracterele observate se noteaza si apoi se utilizeaza pentru identificarea taxonomica; dintre toate posibilitatile de tipizare si identificare taxonomica, biotipizarea este accesibila majoritatii laboratoarelor si in acelasi timp mult utilizata deoarece proprietatile biochimice ale bacteriilor sunt determinate de determinanti genetici cromozomali, astfel ca sunt mai stabile decât alte caractere determinate de determinanti genetici plasmidiali.
- Biotipizarea poate fi realizata cu ajutorul testelor biochimice (fig. 55, 56, 57):
- **Teste individuale** (conventionale sau de referinta); exemple: fig. 56 A, B, D;
- **Sisteme de identificare biochimica multitest**; ex.edii multitest mult utilizate in clinica, pentru identificarea enterobacteriilor, sunt: TSI (fig. 56 C), MIU si MILF.
- **Sisteme microtest** care se efectueaza in microvolume si care asociaza un numar mare de teste in aceeasi placa/tub si care sunt de regula suficiente pentru a realiza o identificare precisa (fig. 57 – galerie API).

Fig. 53. Tipuri morfologice de baza la bacterii.

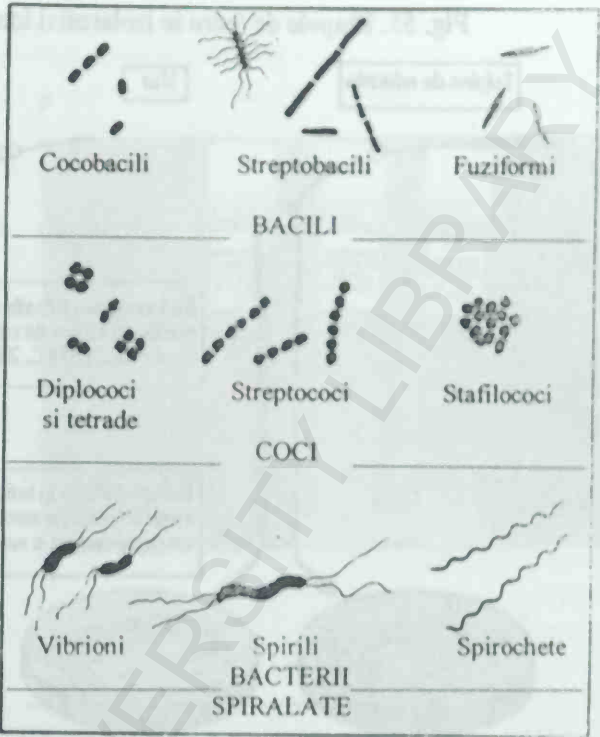
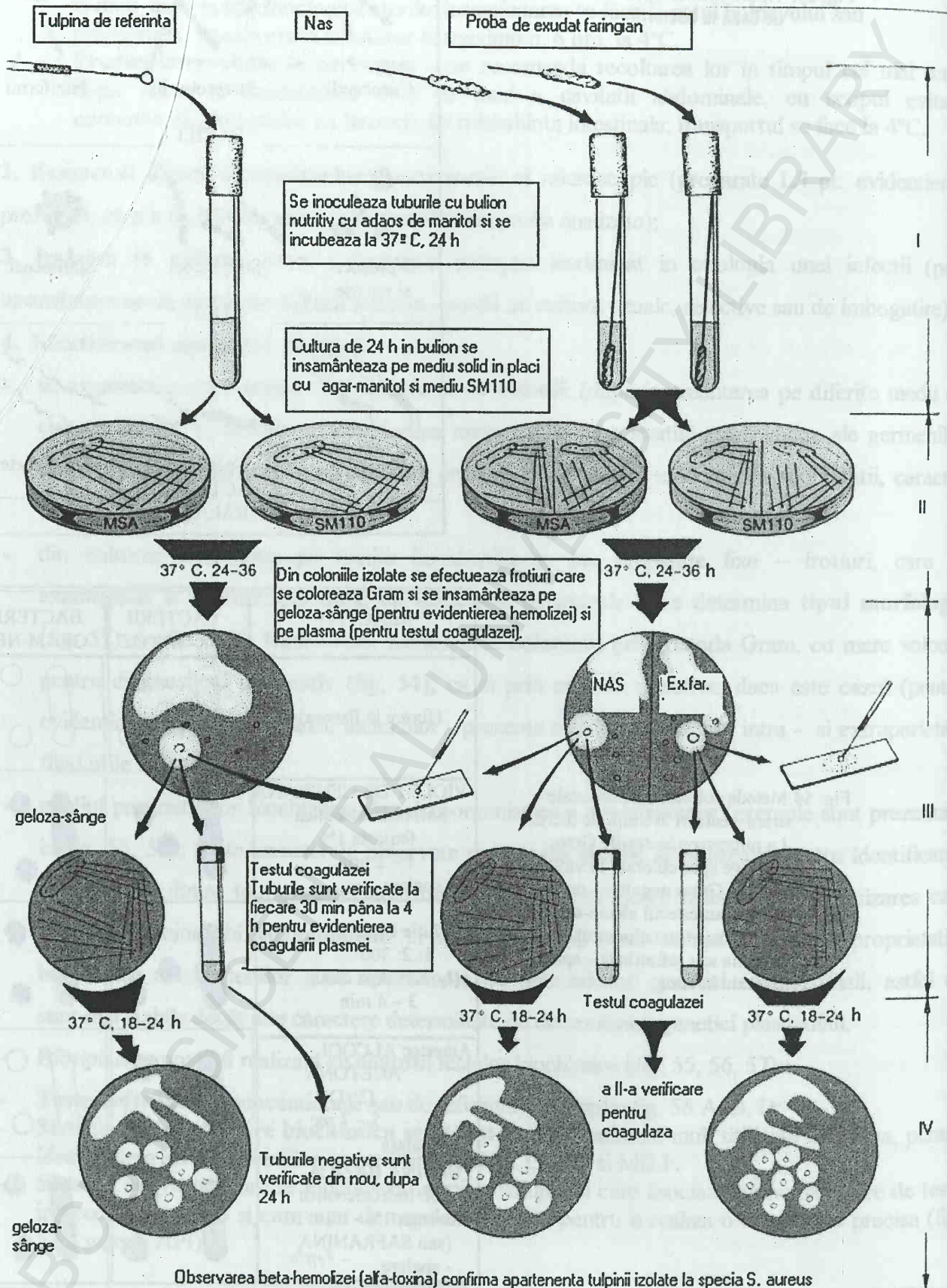


Fig. 54. Metoda coloratiei diferentiale Gram-reactivi si timpi de lucru. La microscop, bacteriile Gram pozitive apar colorate in violet, iar cele Gram negative - decolorate de catre amestecul alcool-acetona si recolorate cu colorantul de contrast (fucsina sau safranina) - apar colorate in rosu.

REACTIVI	BACTERII GRAM-POZ.	BACTERII GRAM-NEG.
(fixare la flacara)		
VIOLET DE GENTIANA Sol. hidroalcoolica fenicata 1% 1 - 2 min - spalare		
Solutie LUGOL 1: 2: 300 (I ₂ : KI : Apa dist.) 3 - 4 min		
Amestec ALCOOL-ACETONA (3: 1) 5 - 7 sec - spalare		
FUCSINA BAZICA Sol. hidroalcoolica fenicata 1% - dil 1/10 (sau SAFRANINA) - spalare		

Fig. 55. Etapele de lucru in izolarea si identificarea prezumtiva a stafilococilor.



A.

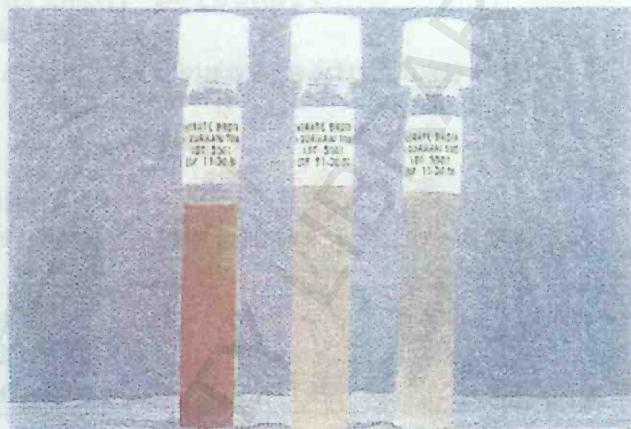
B.

TESTUL OXIDAZEI

+

-

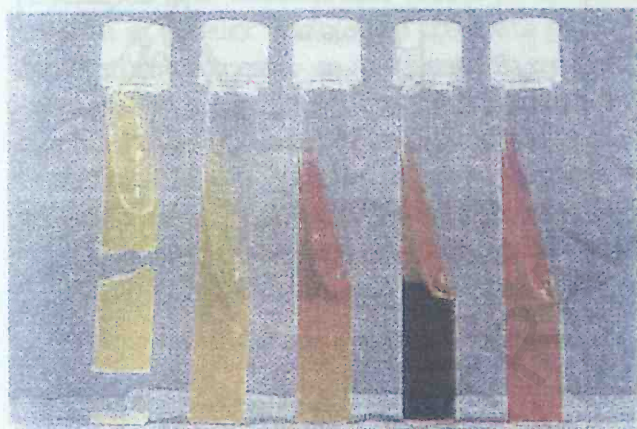
F



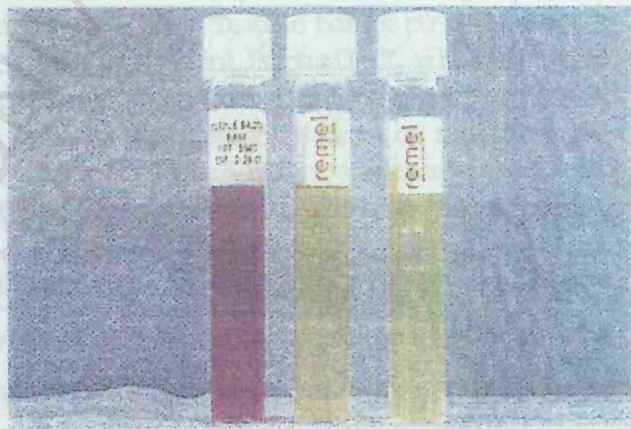
H

C.

D.



a) b) c) d) e)

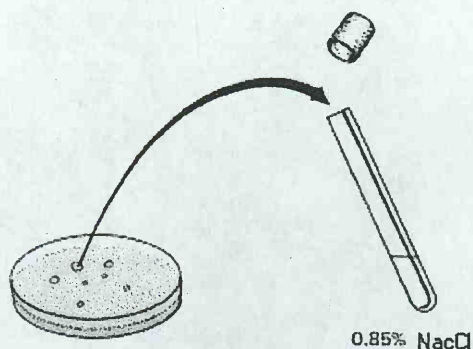


a) b) c)

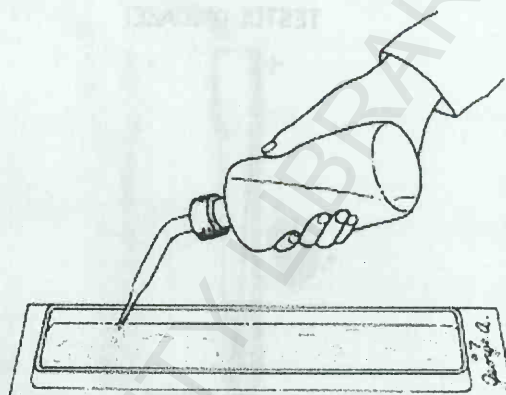
Fig. 56. Identificarea prezumtivă a Enterobacteriilor pe baza caracterelor biochimice.

- A – Metoda cromogena (test individual) pentru testul oxidazei (reactie pozitivă $\Rightarrow$ stânga);
- B - Test individual pentru evidențierea reducerii nitraților la nitriți și N_2 (reactie pozitivă $\Rightarrow$ tubul din stânga);
- C - Diferite reacții biochimice pe mediul multitest TSI : a) fermentarea glucozei + gaz; b) fermentarea glucozei (fără gaz), zaharozei și lactozei; c) fermentarea glucozei (fără gaz), fără fermentarea zaharozei și lactozei; d) producere de H_2S ; e) bacil Gram (-) nefermentativ (nu aparține enterobacteriilor);
- D - Teste individuale de fermentație + tuburi Durham (pentru colectarea gazului rezultat ; a) test pozitiv pentru fermentarea glucidului fără producere de gaz; b) test negativ; c) test pozitiv pentru fermentarea glucidului + producere de gaz.

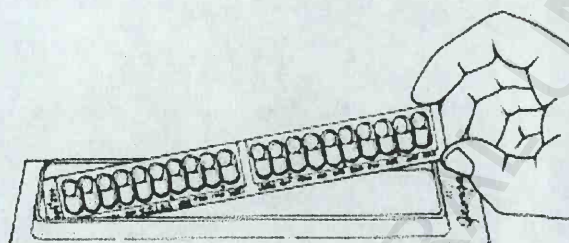
Fig. 57. Etapele de lucru ale identificării biochimice a bacteriilor cu ajutorul galeriilor miniaturizate tip API (BioMérieux).



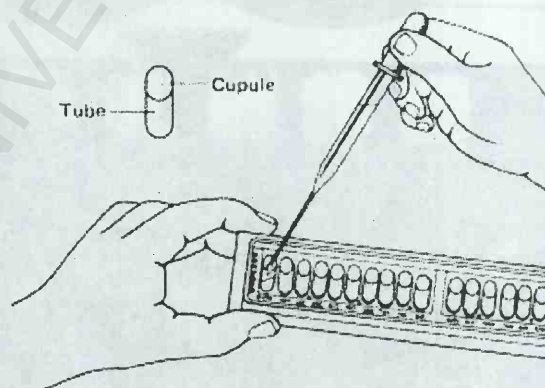
- 1** Se realizează o suspensie bacteriană în soluție salină fiziologică sterilă, plecând de la o colonie de pe mediul pe care s-a făcut izolarea în cultura pură a tulpinii de identificat



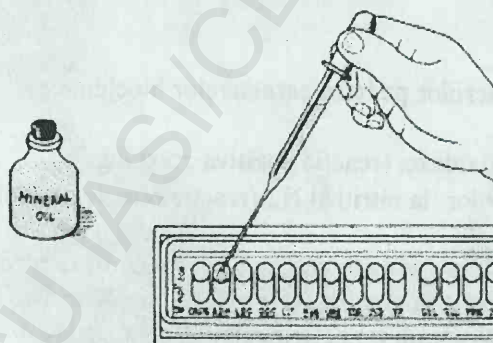
- 2** Se repartizează cca 5 ml de AD în camera de incubare pentru a realiza o atmosferă umedă.



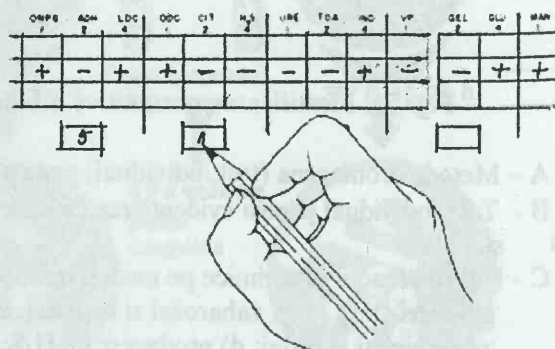
- 3** Se plasează galeria API în camera umedă.



- 4** Se repartizează suspensia bacteriană (inoculul) în toate cele 20 de compartimente.



- 5** Pentru realizarea condițiilor de anaerobioză în compartimentele destinate reacțiilor ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, se adaugă ulei de parafină în porțiunea deschisă (circulară) a acestora.



- 6** După incubare și adăugarea reactivilor adiționali, se însumează cifrele corespunzătoare reacțiilor pozitive, obținându-se un număr de cod cu 7 cifre, interpretarea făcându-se cu ajutorul catalogului API de identificare.

Atât sistemele multitest, cât și cele microtest, prezintă multiple avantaje:

- permit o identificare rapidă comparativ cu testele convenționale;
- permit o identificare mai precisă și standardizarea metodei;
- permit economie de timp, materiale, personal.

-Interpretarea rezultatelor și identificarea agentului infectios -

Identificarea tulpinilor microbiene se poate face cu ajutorul unor sisteme de identificare de tipul :

A. Chei dichotomice

B. Tabele de identificare (sisteme politetice)

C. Programe de identificare asistată de calculator

Principiile pe care se bazează aceste sisteme de identificare au fost prezentate succint la pag. 239.

Metode rapide de identificare/detectare a bacteriilor

Spre deosebire de toate aceste metode de testare a proprietăților biochimice care sunt dependente de creșterea bacteriilor, utilizarea unor teste cu substraturi enzimatică cromogenă și procedeele cromatografice, permit laboratoarelor să identifice precis și rapid numeroase specii de microorganisme. Substraturile cromogene detectează enzime preformate în bacterii și permit identificarea unor microorganisme specifice direct în produsele patologice, metoda nefiind dependentă de creșterea bacteriană. Rezultatele acestor teste rapide sunt luate în considerare, în paralel cu cele tradiționale, bazate pe creșterea pe medii selective, pe examinarea caracterelor de colonie și a celor morfologice observate pe frotiuri colorate Gram. Testele bazate pe utilizarea de substraturi cromogene, se utilizează în paralel și cu testele de tipul "spoturilor", cum ar fi testul catalazei și al oxidazei (fig. 56 A), pentru o identificare prezumtivă corectă a microorganismelor semnificative din punct de vedere clinic. Diferite variante ale acestor tehnici, ca și metoda gaz-cromatografiei pot fi folosite pentru detectarea produsilor bacterieni direct în probele clinice sau pentru a furniza informații ajutătoare identificării bacteriilor la nivel de gen și specie.

5. **Determinarea spectrului de sensibilitate (antibiogramă) tulpinii bacteriene izolate, prin metoda antibiogrammei în varianta difuzimetrică (Kirby-Bauer);** se determină spectrul de sensibilitate la un set de antibiotice, cunoscute ca fiind active pentru grupul de bacterii caruia îi aparține tulpina identificată, dar care sunt supuse fenomenului de dobândire a rezistenței, cu scopul alegerii celui mai potrivit pentru antibioterapie (fig. 59); determinarea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.) și minime bactericide (C.M.B.), utile determinării proprietăților farmacologice ale antibioticelor, ca și calculării dozelor terapeutice sunt schematizate în fig. 58; Mai nou, este utilizată și metoda **E_{test}** (spectru de sensibilitate C.M.I.) (v. fig. 46).

6. **Serotipizarea** permite caracterizarea din punct de vedere antigenic a tulpinii bacteriene izolate, prin evidențierea antigenelor bacteriene, cu seruri imune poli- și monospecifice, metoda aplicată mai ales în studiile epidemiologice; de ex. prin reacții de aglutinare bacteriană (directă) pe lăcăș (fig. 60) și în tub; reacții de latex-aglutinare (aglutinare pasivă).

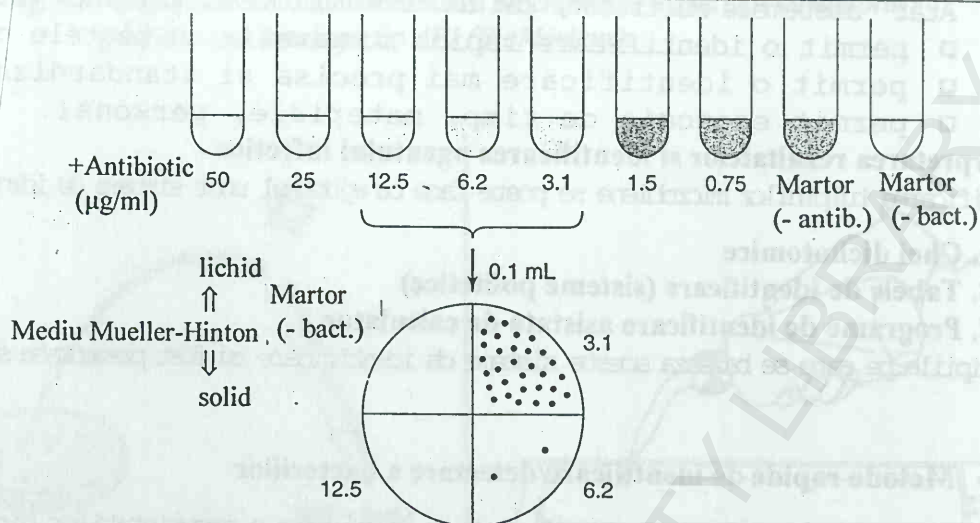


Fig..58. Determinarea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.) și a concentrației minime bactericide (C.M.B.). Setul de tuburi care conțin cantități descrescătoare (dilutii binare) de substanțe antibiotice în mediu de cultura, se inoculează cu tulpina bacteriană de testat. După incubare (la 37°C, 18 h), tuburile se examinează macroscopic și se determină C.M.I., care este indicată de cea mai mică concentrație de antibiotic care inhibă creșterea bacteriană. (în acest exemplu 3,1 µg/ml). Pentru a evidenția și efectul bactericid C.M.B. (nu doar cel bacteriostatic, inhibitor al creșterii), se însămânțează în plăci cu mediu solid fără antibiotice, câte 0,1 ml din tuburile cu concentrații de antibiotic superioare C.M.I. Concentrația de antibiotic care inhibă apariția de colonii în proporție de cel puțin 99,9 % (în acest exemplu 6,2 µg/ml) indică C.M.B.

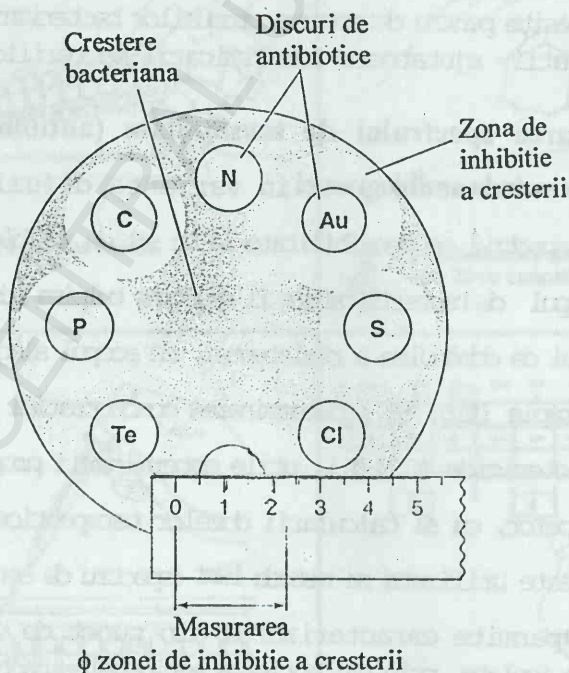


Fig. 59. Testarea sensibilității la antibiotice (antibiograma) prin metoda difuzimetrică Kirby-Bauer. Tulpina bacteriană testată (însămânțată "în pânză" pe mediul solid Mueller-Hinton din placă, pe suprafața căreia s-au plasat discuri de antibiotice, după care placă a fost incubată la 37°C, 18 h) este sensibilă la anumite antibiotice și rezistentă la altele (ex. N, T, Cl). Pentru ca tulpinile să fie considerate sensibile, zonele de inhibiție a creșterii din jurul discurilor de antibiotice trebuie să depășească anumite valori-prag, valori care se găsesc în tabele speciale.

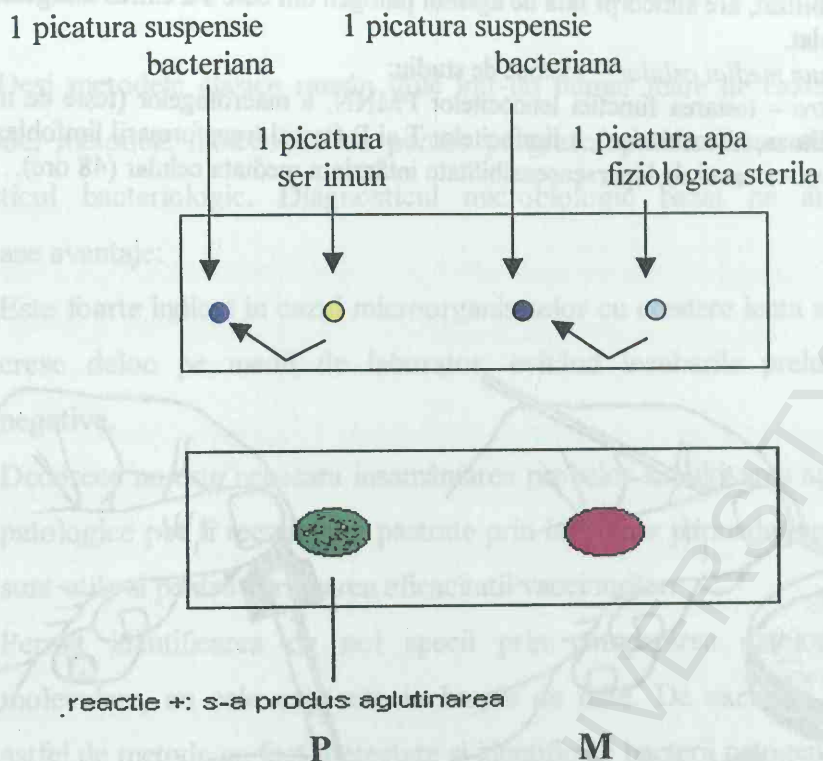


Fig. 60. Schema testului de aglutinare pe lama, realizat prin punerea in contact a unei suspensii bacteriene, realizata prin omogenizarea in apa fiziologica sterila a unei colonii bacteriene dintr-o cultura a tulpinii de serotipizat, cu seruri imune polispecifice si monospecifice, diluate corespunzator titrului reactiei pe lama, indicat de producator (P = proba, M = martor).

7. **Tipizarea cu ajutorul fagilor (lizotipie).** Metoda se bazeaza pe spectrul de gazda limitat al multor bacteriofagi, astfel ca unele linii fagice stabilesc relatii si un ciclu litic doar cu o anumita tulpina a unei specii bacteriene. Se utilizeaza seturi diferite de preparate fagice standardizate, destinate tipajului fagic al unor specii bacteriene, ale caror tulpini nu pot fi diferite prin metode biochimice sau serologice (de ex. pentru tipizarea unor specii ale genurilor *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*). Metoda este utila mai ales epidemiologiei, care studiaza distributia si circulatia tulpinilor bacteriene in populatie si se practica in Centrele Nationale de Referinta pentru bacteriile patogene respective ale Inst. Cantacuzino (etapele de lucru ale lizotipiei sunt schematizate in fig. 61).

II. Diagnostic imunologic (indirect)

- studiul raspunsului imun al organismului gazda, fata de agentul infectious nu este obligatoriu, pentru ca raspunsul imun fata de unii agenti infectiosi este tardiv, slab sau absent (de exemplu, in infectiile locale); se investigheaza:

- *Raspunsul imun mediat umoral* – metode de studiu:

- *in vitro* – reactii serologice Ag-Ac, efectuate cu ser de pacient si antigene de diagnostic, efectuate cu scopul decelarii si titrarii anticorpilor specifici antigenelor utilizate;

- *in vivo* – intradermoreactii (I.D.R.) – cu antigene purificate, injectate intradermic, care permit demonstrarea faptului ca organismul respectiv este sensibilizat, are anticorpi fata de agentul patogen din care s-a extras antigenul inoculat.
- *Raspunsul imun mediat celular* – metode de studiu:
 - *in vitro* – testarea functiei leucocitelor PMNN, a macrofagelor (teste de migrare, de fagocitoza, histochimice), a limfocitelor T si B (testul transformarii limfoblastice);
 - *in vivo* – reactii de hipersensibilitate intarziata mediata celular (48 ore).

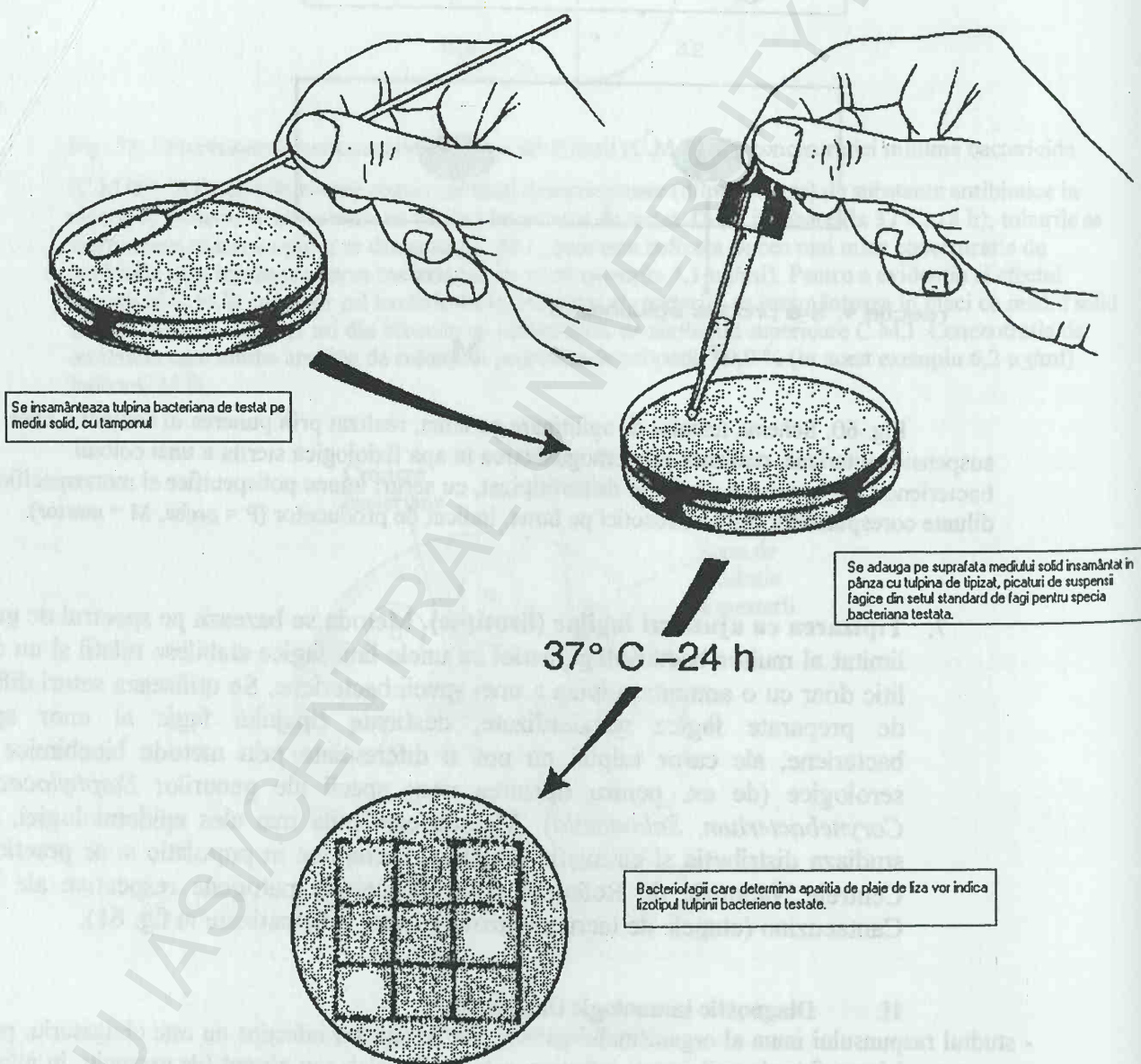


Fig. 61. Ilustrarea metodei lizotipiei (tipizarea tulpinilor bacteriene cu ajutorul fagilor litici), pe etape de lucru.

III. Diagnosticul infectiilor si identificarea agentilor patogeni cu ajutorul tehnicilor moleculare.

Deși metodele clasice rămân utile într-un număr mare de cazuri, pentru bacteriile greu cultivabile, metodele moleculare au permis progrese spectaculoase atât în cercetare, cât și în diagnosticul bacteriologic. Diagnosticul microbiologic bazat pe analize genetice prezintă numeroase avantaje:

1. Este foarte indicat în cazul microorganismelor cu creștere lentă sau care cresc slab sau nu cresc deloc pe medii de laborator, evitând incubările prelungite și rezultatele fals negative.
2. Deoarece nu este necesară însemnarea probelor și cultivarea agentilor patogeni, probele patologice pot fi recoltate și păstrate prin înghețare perioade lungi de timp. Aceste probe sunt utile și pentru verificarea eficacității vaccinurilor.
3. Permit identificarea de noi specii prin compararea datelor obținute prin metode moleculare, cu cele existente în bazele de date. De exemplu, în ultimul deceniu, prin astfel de metode au fost detectate și identificate bacterii patogene, anterior necunoscute : *Bartonella henselae*, *Tropheryma whippelii*.
4. Metodele moleculare pot fi utilizate în diagnosticul infectiilor cu bacterii parazite obligat intracelular (ex. *Rickettsia sp.*, *Bartonella sp.*, *Chlamydia sp.*) și virusuri care necesită pentru cultivare substraturi vii sau pentru care nu există până în prezent metode de cultivare în condiții de laborator. Acești agenți infecțioși pot fi identificați cu ajutorul unor *kit*-uri de diagnostic molecular, standardizate și comercializate. Un exemplu în acest sens este bacteria *C. trachomatis* care poate fi evidențiată direct în probele patologice (secretie vaginală sau uretrală, urină) cu ajutorul unei variante a tehnicii PCR numită LCR (*Ligase Chain Reaction*) (vezi Cap. Bacterii parazite obligat intracelular - *Chlamydia sp.*)

Studiul markerilor genomici se realizează prin amplificarea unui fragment de ADN specific pentru o anumită unitate taxonomică microbiană (tehnica PCR), restricție enzimatică pe genomul total sau pe un anumit fragment amplificat în prealabil, hibridizare cu sonde marcate.

Probe de acizi nucleici

Reprezintă o secvență de ADN care hibridizează specific cu o catenă complementară. O probă poate fi construită pentru a detecta fie ADN, fie ARN. Probele pot fi mici (în lungime de aprox. 20 nucleotide) sau mari (câteva mii de nucleotide). Principiul de bază al tehnologiei

probelor de ADN este hibridizarea, care implica denaturarea moleculelor de ADN dublu catenare, in molecule monocatenare si detectarea acestora cu probe de ADN monocatenar marcate. Testul hibridizarii poate fi folosit pentru:

1) **a demonstra inrudirea genetica** (secvente omologe ale succesiunii de baze in ADN-ul diferitelor organisme, astfel ca au fost utilizate extensiv in construirea unor scheme taxonomice filogenetice, de obicei prin analiza secventelor de ARNr 16 S inalt conservate); de ex., pentru stabilirea taxonomiei bacteriilor aparținând genurilor *Campylobacter* si *Helicobacter*, s-au folosit tehnici moleculare: hibridizarea ADN -ARNr, analiza secventiala a moleculelor de ARNr 16S;

2) **diagnosticul de laborator al unor boli infectioase**. In acest caz, probele de ADN sunt utilizate pentru confirmarea unor rezultate obtinute prin metode conventionale sau ca o alternativa la aceste metode consumatoare de timp sau a unora foarte laborioase. Sunt de asemenea utilizate pentru detectarea directa in probele clinice a unor microorganisme patogene cu crestere lenta sau saraca, Aceasta **metoda directa** (fara procedura de amplificare a ADN) este mult mai putin sensibila, pentru ca numarul microorganismelor specifice prezente in proba, poate fi sub pragul de sensibilitate al testului. In absenta amplificarii inainte de testare, testele comerciale disponibile pot detecta cel putin 10^4 - 10^6 copii ale secventei specifice de ADN. **Prin amplificare, in varianta indirecta a tehnicii**, pot fi detectate 10 sau chiar mai putine copii initiale ale moleculelor specifice de ADN. Când probele sunt folosite pentru confirmarea identitatii unui microorganism cultivat, numarul copiilor -tinta depaseste cu mult pragul de sensibilitate al testului.

Studiul markerilor plasmidiali: stabilirea profilului plasmidial prin evidentierea la mai multe tulpini a prezentei aceleiasi plasmide (de **virulenta/ rezistenta la antibiotice**), constituind un prim indicator de similitudine;

- Extragerea plasmidelor, compararea greutatii moleculare prin electroforeza in gel de agaroză;
- Compararea profilurilor electroforetice ale plasmidelor dupa restrictie enzimatica;
- Se cerceteaza daca gena este prezenta pe acele plasmide, practicându-se hibridizarea dupa transferul ADN pe membrane de nylon (tehnica *Southern blott*).

De exemplu, existenta unor plasmide si determinanti genomici de rezistenta similari la tulpinile izolate din diverse medii poate demonstra transmiterea pe orizontala a determinantilor genetici de rezistenta ca efect al impactului ecologic al antibioticelor asupra bacteriilor.

Automatizarea mai accentuata a tehnicilor moleculare este o necesitate care ar face aceasta tehnologie accesibila unui numar mai mare de laboratoare.

BIBLIOGRAFIE

1. ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S., 2000, *Cellular and Molecular Immunology*. Fourth Ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia.
2. ADELSMAN, MARGARET, SHIMIZU, YOJI, 1998, *Adhesion molecules*. In: "Encyclopedia of Immunology", P.J., Roitt, I.M., eds.), Sec. Ed., Academic Press Inc., San Diego California, p. 26 – 33.
3. ADU-BOBIE, JEANNETTE, FRANKEL, G., BAIN, C., GONCALVES, AZIZEDIDE G., TRABULSI, L.R., DOUCE, G., KNUITON, S., DOUGAN, G., 1998, *Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens*. J. of Clinical Microbiol., **36** : 662 – 668.
4. ALBERT, J.M., QADRI, F., HAQUE, A., BHUIYAN, N.A., 1993, *Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative Escherichia coli.* Journal of Clinical Microbiol., **31**: 1397 – 1399.
5. ALCAMO, E., 1997, *Fundamentals of Microbiology*. Fifth Ed., Benjamin / Cummings Publ.Comp.
6. ALEXANDRU, D., 1996, *Biochimia si rolul fizio-patologic al moleculelor de adeziune celulare*. St. Cerc. Biochim., **39** (1-2): 17 – 41.
7. ALLISON, A.C., EUGUI, ELSIE M., 1995, *Induction of cytokine formation by bacteria and their products*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., 303- 333.
8. AMANO, A., SHARMA, A., SOJAR, H.T., KURAMITSU, H.K., GENCO, R.J., 1994, *Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by Porphyromonas gingivalis*. Inf. and Immun., **62**: 4682 – 4685.
9. ANDREMONT, A., RAIBAUD, P., TANCREDE, C., DUVAL-IFLAH, YVONNE, DUCLUZEAU, R., 1985, *The use of germe- free mice associated with human fecal flora as an animal model to study enteric bacterial interactions*. Bacterial Diarrheal Diseases, KTK Scient. Publish., Tokio, p. 219 - 227.
10. ANDREMONT, A., 1987, *Infections sur matériel d'infection parérentérale prolongée*. Médecine et maladies infectieuses, 323 - 325.
11. ANDREMONT, A., 1989, *Candida in the gactrointestinal tract: from colonization to disease*. In: "Opportunistic fungal infections: Focus on fluconazole" (Richardson, R.G., ed.). Royal Soc. of Medicine Services Internat. Congress and Symposium, Series No. 153.
12. ANDREMONT, A., 1990, *Ecosystème intestinal et antibiothérapie*. La Lettre de l'Infectiologue, Tome V : 100-103.
13. ANDREMONT, A., 1991, *Épidemiologie et diagnostic indirect des infections à levures en cancérologie*. J. Mycol. Med., 1, Suppl. I: 2 - 3.
14. ANDREMONT, A., 1992, *Effect of beta-lactam antimicrobial agents on the intestinal écosystem and its possible role in antibiotic-associated diarrhoea*. In: "Cefaclor: Into the next decade" (Cole, P., ed.). Royal Society of Medicine Services International Congress and Symposium Series No. 188, p. 61 – 65.
15. ANGHEL, I., COJOCARU, I., TOMA, N., COJOCARU, J., 1989, *Biologia si tehnologia levurilor*. vol. I, Edit. Tehnica, Bucuresti, p. 15-26.
16. ANGHEL, I., VASSU, T., SEGAL, B., BERZESCU, P., HERLEA, V., DAN, V., OANCEA, I., KATHREIN, I., 1991, *Biologia si tehnologia levurilor*. vol. II, Edit. Tehnica, Bucuresti, p. 360 - 363.
17. ANWAR, H., DASGUPTA, M.K., COSTERTON, W.J., 1990, *Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents*. Antimicrobial agents and chemotherapy, **34**: 2043 – 2046.
18. ANWAR, H., STRAP, J.L., COSTERTON, W.J., 1992, *Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy*. Antimicrobial agents and chemotherapy, **36**: 1347 – 1351.
19. BAIN, C.K., COLLINGTON, G.K., TRABULSI, L.R., KNUITON, S., 1998, *Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. Inf. and Immunity, **66**: 3900 – 3908.
20. BALISH, E., FILUTOWICZ, H., 1991, *Serum antibody response of gnotobiotic athymic and euthymic mice following alimentary tract colonization and infection with Candida albicans*. Can. J. of Microbiol., **37**: 204 - 210.
21. BALOWS, A.(ed.), 1991, *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed., Amer. Soc. For Microbiology, Washington D.C.
22. BALS, M., 1982, *Laboratorul clinic in infectii*, Editura Medicala, Bucuresti.

23. BARKI, M., KOLTIN, Y., van WETTER, M., ROSENBERG, M., *A Candida albicans surface antigen mediating adhesion and autoaggregation in Saccharomyces cerevisiae*. Inf. and Immunity, **62**: 4107 - 4111.
24. BARNES, L.M., LO, M.F., ADAMS, M.R., CHAMBERLAIN, H.L., 1999, *Milk and milk proteins prevent bacterial adhesion*. Appl. Environ. Microbiol., **65**: 4543 - 4548.
25. BASARABA, R.J., BYERLY, A.N., STEWART, G.C., MOSIER, D.A., FENWICK, B.W., CHENGAPPA, M.M., LAEGREID, W.W., 1998, *Actin enhances the haemolytic activity of Escherichia coli*. Microbiology, **144**: 1845 - 1852.
26. BAUMLER, A.J., TSOLIS, R.M., HEFFRON, F., 1996, *Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by Salmonella typhimurium*. Inf. and Immunity, **64**: 1862 - 1865.
27. BEACHEY, E.H.(ed.), 1980, *Bacterial adherence: Receptors and recognition*. Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London.
28. BEACHEY, E.H., 1981, *Bacterial adherence: adhesin - receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal cells*. J. Inf. Dis., **143**: 325 - 345.
29. BEVERIDGE, T.J., 1993, *Current trends and future prospects in prokariotic envelope research: a microscopist's view*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74**: 143S - 154S.
30. BEZIRTZOGLU, EUGENIA, 1997, *The intestinal microflora during the first weeks of life*. Anaerobe, **3**: 173 - 177.
31. BIBEL, DEBRA JAN, ALY, RAZA, SHINEFIELD, H.R., 1992, *Inhibition of microbial adherence by sphinganine*. Can. J. of Microbiol., **38**: 983 - 985.
32. BLENKINSOPP, S.A., COSTERTON, J.W., 1991, *Understanding bacterial biofilms*. Elsevier Sc. Publish. Ltd. (UK), Tibtech, **9**: 138 - 143.
33. BLOCK, J.-C., 1999, *Adhésion-agrégation des bactéries : comportement individuel ou social ?* Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14**(1): 13 - 18.
34. BLOT, F., NITENBERG, G., CHACHATY, ELISABETH, RAYNARD, B., GERMANN, NATHALIE, ANTOUN, S., LAPLANCHE, AGNES, BRUN-BUISSON, C., TANCREDE, C., 1999, *Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures*. The Lancet, **354**: 1071- 1077.
35. BONNER, M.C., TUNNEY, M.M., JONES, D.S., GORMAN, S.P., 1997, *Factors affecting in vitro adherence of ureteral stent biofilm isolates to polyurethan*. Appl. Environ. Microbiol., **61** : 187 - 193.
36. BOS, R., van der MEI, H.C., BUSSCHER, H.J., 1996, *Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity on the co-adhesion of oral microbial pairs*. Microbiology, **142**: 2355 - 2361.
37. BOUGNOUX, M.-E. si colab., 1990, *Comparison of antibody, antigen and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis*. J. of Clinical of Microbiol., **28**: 905 - 909.
38. BOULLOCHE, J., MOUTERDE, O., MALLET, E., 1994, *Traitement des diarrhées aiguës chez le nourrisson et le jeune enfant. Étude contrôlée de l'activité antidiarrhéique de L. acidophilus tués (souche LB), contre un placebo et un médicament de référence (loperamide)*. Annales de Pédiatrie, **41**: 457 - 463.
39. BOUVET, J.P., BELEC, L., PIRES, R., PILLOT, J., 1994, *Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination*. Inf. and Immunity, **62**: 3957 - 3961.
40. SHANSON, D.C., 1999, *Microbiology Clinical Practice*. Third Ed., Butterworth Heinemann, Oxford.
41. BRANDTZAEG, P., HALSTENSEN, T.S., KETT, K., KRAJCI, P., KVALE, D., ROGNUM, T.O., SCOTT, H., SOLLID, L.M., 1989, *Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes*. Gastroenterology, **97**: 1562 - 1584. 1
42. BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J., 1994, *Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International, Inc., Seventh Ed., New Jersey, p. 402 - 408, 571 - 573.
43. BROWN, M.R.W., GILBERT, P., 1993. *Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74**: 87S - 97S.
44. BUIUC, D., NEGUT, M., 1999, *Tratat de microbiologie clinica*. Editura Medicala, Bucuresti.
45. BUSSCHER, H.J., GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G.I., VAN DER MEI, H.C., 1993, *On mechanisms of oral microbial adhesion*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74**: 136S - 142S.
46. BUSSCHER, H.J., BOS, R., van der MEI, H.C., 1995, *Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion*. FEMS Microbiology Letters, **128**: 229 - 234.

47. CALDERONE, R., ENACHE, ELENA, ESKANDARI, TARA, WADSWORTH, ELSA, STURTEVANT, J., 1996, *Adherence of Candida albicans to mammalian cells in vitro: nutritional influences*. The Abstracts Review of The Third Conference of Cell cultures, Kyoto, Japan, p. 596 – 605.
48. CARBALLO, JULIA, FERREIROS, C., 1992, *Adherencia bacteriana en las infecciones asociadas a dispositivos protésicos implantados*. Cadernos de revision 2, Univ. de Santiago de Compostella, Ed. Servicio de Publicacions e Intercambio Cientifico, p. 9 - 56.
49. CARPENTIER, BRIGITTE, 1999, *Les Biofilms* (2). Bull. Soc. Fr. Microbiol., **14** (2): 105-111.
50. CERI, H., OLSON, M.E., STREMICK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A., 1999, *The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. J. of Clinical Microbiol., **37**: 1771 – 1776.
51. CHACHATY, E., YOUSSEF, M.T., BOURNEIK, C., ANDREMONT, A., 1995, *Shedding of antibiotic-resistant members of the family Enterobacteriaceae in healthy residents of France and Jordan*. Res. Microbiol., **146**: 175-182.
52. CHAUVIERE, G., COCONNIER, MARIE – HELENE, KERNEIS, SOPHIE, DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, JOLY, B., SERVIN, A., 1992, *Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed Lactobacillus*. FEMS Microbiology Letters, **91**: 213 – 218.
53. CHIRICUTA, I. (red.), 1984, *Cancerologie. Vol I Cancerologie generala*. Ed. Medicala, Bucuresti, p. 313, 421-436.
54. CODITA, IRINA, DUMITRESCU, VIORICA, GRIGORE, L., 1997, *Evidentierea producerii de «slime» - marker de patogenitate pentru stafilococii coagulaza negativi*. Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, **42** (3): 155 – 157.
55. COLLE, J.T., SESHAN, K.R., PHANEUF, M., LYNN, K.T., 1991, *Chlamydospore-like cells of Candida albicans in the gastrointestinal tract of infected immunocompromised mice*. Can J. of Microbiol., **37**: 637-646.
56. COLLIER, A.M., 1980, *Attachment of Mycoplasma pneumoniae to respiratory epithelium*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 159 – 183.
57. COLLINS, C.H., LYNE, P.M., 1976, *Microbiological Methods*, Laboratory Techniques Series, Butherworths, London.
58. COOGAN, M.M., SWEET, S.P., CHALLACOMBE, S.J., 1994, *Immunoglobulin A (IgA), IgA1 and IgA2 antibodies to Candida albicans in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS*. Inf. and Immunity, **62**: 892 -896.
59. COSTERTON, J.W., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1989, *Behavior of bacteria in biofilms*. ASM News, **55**: 650 - 654.
60. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M., 1995, *Microbial Biofilms*. Ann. Rev. Microbiol., **49** : 711 -745.
61. CUSHION M.T., 1998, *Taxonomy, genetic organization and life cycle of P. carinii*. Semin. Respir. Infect., 1998, **13**: 304-314.
62. CRAVIOTO, A., GROSS, R.J., SCOTLAND, S.M., ROWE, B., 1979, *An adhesive factor found in strains of Escherichia coli belonging in the traditional infantile enteropathogenic serotypes*. Curr. Microbiol., **3**: 95 – 99.
63. CUNDELL, DIANA R., TUOMANEN, E., 1995, *Attachment and interaction of bacteria at respiratory mucosal surfaces*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. I. Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J., eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 3 – 20.
64. DAILEY, M.O., 1993, *The selectin family of cell-adhesion molecules*. In: "Lymphocyte adhesion molecules" (Shimizu, Y., ed.), R.G. Landes Comp., Austin.
65. DAVIES, D.G., CHAKRABARTY, A.M., GEESEY, G.G., 1993, *Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environm. Microbiol., **59**: 1181 - 1186.
66. DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W., GREENBERG, E. P., 1998, *The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm*. Science, **280**: 295 – 298.
67. DEITSCH, K.W., MOXON, E.R., WELLEMS, T.E., 1997, *Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal and fungal infections*. Microbiol. And Molecular Biology Rev., **61**: 281 – 293.
68. DEBELEAC, LUCIA, POPESCU-DRANDEA, M.C., 1994, *Microbiologie*. Editura Medicala Amaltea, Bucuresti.
69. DELVES, P.J., ROITT, I.M.(eds.), *Encyclopedia of Immunology*. Sec. Ed., Academic Press Inc., San Diego California.

70. DEMAİN, A.L., DAVIES, J.E. (Eds. in chief), 1999, *Manual of Microbiology and Biotechnology*. Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C.
71. DERETIC, V., SCHURR, M.J., HONGWEI, YU, 1995, *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis. *Trends in Microbiology*, **3**: 351-355.
72. DESLAURIERS, N., MICHAUD, J., CARRÉ, B., LÉVEILLÉ, C., 1996, *Dynamic expression of cell-surface antigens probed with Candida albicans-specific monoclonal antibodies*. *Microbiology*, **142**: 1239 – 1248.
73. DIMA, V.F., PETROVICI, A., DIMA, S.V., 1990, *Characterization of colonization factor antigen CFA/I from an enterotoxigenic Escherichia coli strain (0128:H12)*. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, **49**: 297 – 313.
74. DIMARTINO, P., BERTIN, Y., GIRARDEAU, J.P., LIVRELLI, VALERIE, JOLY, B., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, 1995, *Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of Klebsiella pneumoniae strains involved in nosocomial infections*. *Inf. and Immunity*, **63**: 4336 – 4344.
75. DIMARTINO, P., SIROT, D., JOLY, B., RICH, C., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, 1997, *Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in Klebsiella pneumoniae clinical isolates*. *J. of Clinical Microbiology*, **35**: 1499 – 1503.
76. DIXON, B., 2000, *Changing pictures of pathogenicity and virulence*. *ASM News*, **66**: 2 – 3.
77. DIXON, B., 2000, *The ecology of pathogens*. *ASM News*, **66**: 122 – 127.
78. DOGARU, G.A., URSEA, N., *Etiopatogenia infectiilor urinare*. *Nefrologia*, **4** (12): 133 – 151.
79. DOMENICO, P., SALO, R.J., CROSS, A.S., CUNHA, B.A., 1994, *Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in Klebsiella pneumoniae*. *Inf. and Immunity*, **62**: 4495 – 4499.
80. DOOLITTLE, M.M., COONEY, J.J., CALDWELL, D.E., 1995, *Lytic infection of Escherichia coli biofilms by bacteriophage T4*. *Can. J. of Microbiol.*, **41**: 12 – 18.
81. DORN, B.R., DUNN Jr., W.A., PROGULSKE-FOX, A., 1999, *Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens*. *Inf. and Immunity*, **67**: 5792 – 5798.
82. DOUCET-POPULAIRE, FLORENCE, TRIEU-CUOT, P., ANDREMONT, A., COURVALIN, P., *Conjugal transfer of plasmid DNA from Enterococcus faecalis to Escherichia coli in digestive tracts of gnotobiotic mice*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **36**: 502 – 504.
83. DOUGLAS, L.J., 1987, *Adhesion to surfaces*. In: "The Yeasts. Vol 2. The yeasts and the environment". (Rose, A.H., Harrison, J.S., eds.). Sec. ed., Acad. Press Inc., London, p. 239-280.
84. DUCA, EUGENIA, DUCA, M., FURTUNESCU, G., 1979, *Microbiologie medicala*. Ed. Did.si Ped., p. 400 – 448.
85. DUCLUZEAU, R., CERF, M., CORTHER, G., RAMBAUD, J.C., CHAPOY, P., AUJARD, Y., ELMER, G.W., 1989, *Microbial Ecology and Intestinal Infections*. E. Bergogne Berezin (Ed.), Springer - Verlag, Paris, p. 11 - 16.
86. DUGUID, J.P., OLD, D.C., 1980, *Adhesive properties of Enterobacteriaceae*. In: *Bacterial adherence: Receptors and recognition* (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 185-217.
87. ENACHE, ELENA, ESKANDARI, TARA, BORJA, LETICIA, WADSWORTH, ELSA, HOXTER, BECKY, CALDERONE, R., 1996, *Candida albicans adherence to a human oesophageal cell line*. *Microbiology*, **142**: 2741 - 2746.
88. ENER, B., DOUGLAS, L.J., 1992, *Correlation between cell-surface hydrophobicity of Candida albicans adhesion to bucal epithelial cells*. *FEMS Microbiology Letters*, **99**: 37 - 42.
89. EVANS, G.D., EVANS, D.J., CLEGG, S., PAULEY, J.N., 1979, *Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic Escherichia coli*. *Inf. and Immunity*, **25**: 738.
90. FALK, P.G., HOOPER, LORA V., MIDTVEDT, T., GORDON, J.I., 1998, *Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology*. *Microbiology and Molecular Biology Rev.*, **62**: 1157 – 1170.
91. FALKOW, S., TOMPKINS, LUCY S., 1999, *The application of molecular biology to medical bacteriology: yesterday, today and tomorrow*. *ASM News*, **65**: 317 – 321.
92. FARINHA, M.A., CONWAY, BD., GLASIER, M.G., ELLERT, N.W., IRVIN, R.T., SHERBURNE, R., PARANCHYCH, W., 1994, *Alteration of the pilin adhesin of Pseudomonas aeruginosa PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice*. *Inf. and Immunity*, **62**: 4118 – 4123.
93. FAVREBONTE, S., DARFEUILLEMICHAUD, A., FORESTIER, C., 1995, *Aggregative adherence of Klebsiella pneumoniae to human intestine 407 cells*. *Inf. and Immunity*, **63**: 1318 – 1328.
94. FIDEL, P.L.Jr., LYNCH, MARIA E., SOBEL, J.D., 1994, *Effects of preinduced Candida – systemic cell-mediated immunity on experimental vaginal candidiasis*. **62**: 1032 – 1038.
95. FILLER, S.G., IBE, B.O., IBRAHIM, A.S., GHANNOUM, M.A., USHA RAJ, J., EDWARDS, J.E., Jr., 1994, *Mechanisms by which Candida albicans induces endothelial cell prostaglandin synthesis*. *Inf. and Immunity*, **62**: 1064 - 1069.

96. FINKELSTEIN, R.A., 2000, *Personal reflexions on cholera: the impact of serendipity*. ASM News, **66**: 663 – 667.
97. FINLAY, B.B., SIEBERS, ANNETTE, 1995, *Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap.I. Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p.33 – 45.
98. FINLAY, B.B., FALKOW, S., 1997, *Common themes in Microbial Pathogenicity Revisited*. Microbial and Molecular Biology Reviews, **61**: 136 -169.
99. FRANKEL, G., CANDY, D.C.A., EVEREST, P., DOUGAN, G., 1994, *Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli, Citrobacter freundii and Hafnia alvei*. Inf. and Immunity, **62**: 1835-1842.
100. FRETER, R., 1980, *Prospects for preventing the association of harmful bacteria with host mucosal surfaces*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition"(Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 439 – 458.
101. GABRIEL, M.M., SAWANT, A.D., SIMMONS, R.B., AHEARN, D.G., *Effects of silver on adherence of bacteria to urinary catheters: in vitro studies*. Current Microbiology, **30**: 17 - 22.
102. GALDIERO, EMILIA, DONNARUMMA, GIOVANNA, de MARTINO, LUISA, MARCATILI, ANTONELLA, CIPOLLARO de l'ERO, GABRIELLA, MERONE, ANGELA, 1994, *Effect of low-nutrient seawater on morphology, chemical composition and virulence of Salmonella typhimurium*. Arch. Microbiol., **162**: 41 – 47.
103. GANDER, SARAH, 1996, *Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents*. J. of Antimicrobial Chemotherapy, **37**: 1047 – 1050.
104. GATERMANN, S., MEYER, H.-G., 1994, *Staphylococcus saprophyticus hemagglutinin binds fibronectin*. Inf. and Immunity, **62**: 4556 – 4563.
105. GESTIN, J.L., GOLDSTEIN, F.W., ACAR, J.F., 1991, *Atlas de Bactériologie. Examen directs par colorations usuelles*. Ed. PIL (Bayer Pharma).
105. GIBBONS, R.J., HOUTÉ, J., 1980, *Bacterial adherence and the formation of dental plaques*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 61-104.
106. GILBERT, P., EVANS, D.J., BROWN, M.R.W., 1993, *Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sci. Pub., Oxford., **74**: 67S – 78S.
107. GIRON, J.A., GOMEZ DUARTE, O.G., JARVIS, K.G., KAPER, J.B., 1997, *Longus pilus of enterotoxigenic Escherichia coli and its relatedness to other type-4 pili—A minireview*. Gene, **192**: 39 – 43.
108. GIUGLIANO, L.G., RIBEIRO, S.T.G., VAINSTEIN, M.H., ULHOA, C.J., 1995, *Free secretory component and lactoferrin of human milk inhibit the adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli*. J. Med. Microbiol., **42**: 3-9.
109. GLUSHKA, J., CASSELS, F. J., CARLSON, R.W., van HALBEEK, H., 1992, *Complete structure of the adhesin receptor polysaccharide of Streptococcus oralis ATCC 55229 (Streptococcus sanguis HI)*. Biochemistry, **31**: 10741 – 10746.
110. GOMEZ-DUARTE, O.G., KAPER, J.B., 1995, *A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli*. Inf. and Immunity, **63**: 1767 – 1776.
111. GRANATO, DOMINIQUE, PEROTTI, FABIENNE, MASSEREY, ISABELLE, ROUVET, MARTINE, GOLLIARD, MIREILLE, SERVIN, A., BRASSART, DOMINIQUE, *Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of Lactobacillus johnsonii La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells*. Appl. and Environ. Microbiol., **65**: 1071 – 1077.
112. GREWAL, J.S., TEWARI, R.P., 1990, *Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs*. J. Med. Microbiol., **32**: 223-226.
113. GRIGORIU, D., DELACRETAZ, I., BORELLI, D., 1986, *Traité de mycologie médicale*. Ed. Roche-Bale, Paris.
114. GROISMAN, E.A., OCHMAN, H., 2000, *The path to Salmonella*. ASM News, **66**: 21 – 26.
115. GROISMAN, E.A.(Ed.), 2001, *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, San Diego.
116. GOLDSBY, R., KINDT, T.J., OSBORNE, BARBARA A., 2000, *Kuby Immunology*. Fourth Ed., W.H. Freeman & Comp., New York.
117. GREWAL, J.S., TIWARI, R.P., 1990, *Resistance to metal ions and antibiotics in Escherichia coli isolated from foodstuffs*. J. Med. Microbiol., **32**: 223 – 226.
118. GRISTINA, A.G., 1987, *Biomaterial - Centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science, **23**: 1588 - 1595.

119. HAMADA, S., SLADE, H.D., 1980, *Mechanisms of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces in vitro*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 105-135.
120. HAMILTON, W.A., CHARACKLIS, W.G., 1989, *Relative activities of cells in suspension and biofilms*. In: "Structure and function of biofilms" (1993, Characklis, W.A., Wielderer, P.A. eds.), Dahlem Konferenzen, p. 199-219.
121. HASLAM, D.B., BOREN, T., FALK, P., IILVER, D., CHOU AMY, XU ZHENG, NORMARK, S., 1994, *The amino-terminal domain of the P - pilus adhesin determines receptor specificity*. Molecular Microbiology, 14: 399 - 409.
122. HAWSER, S.P., DOUGLAS, JULIA L., 1994, *Biofilm formation by Candida species on the surface material in vitro*. Inf. and Immunity, 62: 915 - 921.
123. HAWSER, S.P., BAILIE, G.S., DOUGLAS, JULIA L., 1994, *Production of extracellular matrix by Candida albicans biofilms*. J. Med. Microbiol., 47: 253 - 256.
124. HAZEN, K.C., 1995, *New and emerging yeast pathogens*. Clinical Microbiology Reviews, 8: 462 - 468.
125. HAZENBOS, B., WOUTER, L.W., BERNARD, M., VAN'T WOUT, J.W., MOOI, F.R., VAN FURTH, R., 1994, *Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized Bordetella pertussis by human monocytes*. Inf. and Immunity, 62: 4818 - 4824.
126. HECZKO, URSULA, ABE, A., FINLEY, B.B., 2000, *In vivo interactions of rabbit enteropathogenic Escherichia coli O 103 with its host: an electronic microscopic and histopathologic study*. Microbes and Infection, 2: 5 - 16.
127. HEJAZI, A., FALKINER, F.R., 1997, *Serratia marcescens*. J. of Medical Microbiology, 46: 903 - 912.
128. HELD, T.K., ADAMCZIK, TRAUTMANN, M., CROSS, A.S., 1995, *Effects of MICs and sub-MICs of antibiotics on production of capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 39: 1093 - 1096.
129. HENDERSON, B., POOLE, S., WILSON, M., 1996, *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis*. Microbiological Reviews, 60: 316 - 341.
130. HERLEA, V., LAZAR, V., CANJA, D., 1994, *Yeasts as a Model Eukaryotic Cell-Biotechnological Implications*. Proceeding of the 8th National Symposium of Industrial Microbiology and Biotechnology (Anghel, I., ed.), Bucharest, 103 - 112.
131. HERLEA, VICTORIA, CANJA, DOINA, LAZAR, VERONICA, 1997, *Molecular Taxonomic Studies of Listeria monocytogenes with Practical Applications in Clinical Diagnosis and Epidemiology*. Revue Roumaine de Biologie Tome 42, no. 1-2, p. 43-48.
132. HERLEA, VICTORIA, LAZAR, VERONICA, CIOLAC-RUSSU, ANCA, BULAI, DOINA, 1997, *Studiul frecventei tulpinilor de enterobacterii rezistente la antibiotice la purtatori sanatosi*. Analele Universitatii din Bucuresti, Sectia Biologie, XLVI: 57 - 62.
133. HERLEA, VICTORIA, 1998, *Microbiologie generala*. Editura Universitatii din Bucuresti, Bucuresti.
134. HOCINI, H., ISCAKI, S., BOUVET, J.P., PILLOT, J., 1993, *Unexpectedly high levels of some presumably protective secretory immunoglobulin A antibodies to dental plaque bacteria in salivas of both caries-resistant and caries - susceptible subjects*. Inf. and Immunity, 61: 3597 - 3604.
135. HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. A., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T., 1994, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, p.175 - 252.
136. HOSCHUTZKY, H., LOTTSPEICH, F., JANN, K., 1989, *Isolation and characterization of the α -galactosyl-1,4- β -galactosyl - specific adhesin (P adhesin) from fimbriated Escherichia coli*. Inf. and Immunity, 57: 76 - 81.
137. HOWARD, D.H., 1999, *Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi*. Clinical Microbiology Reviews, 12: 394 - 404.
138. HOYLE, B., 2000, *Colonization-resistant polymer helps battle catheter-related infections*. ASM News, 66: 131 - 132.
139. HUDSON, BARBARA, K., SHERWOOD, LINDA, 1997, *Explorations in microbiology - A discovery-based approach*. Prentice Hall, New Jersey, p. 228 - 235.
140. HURLEY, ROSALINDE, de LOUVOIS, J., MULHALL, A., 1987, *Yeasts as human and animal pathogens*. In: "The yeasts. Vol. 1. Biology of yeasts" (Rose, A.H., Harrison, J.S., eds.), Sec. ed., Academic Press Inc., London, p. 207 - 281.
141. ISCAKI, S., BOUVET, J.P., 1993, *Human secretory immunoglobulin A and its role in mucosal defence*. Bull. Inst. Pasteur, 91: 203 - 224.
142. ISRAIL, ANCA-MICHAELA, BALOTESCU, CARMEN, 2000, *Virulence factors in Vibrio cholerae non-O1 and O1 strains isolated in Romania during cholera epidemics between 1990 - 1995*. Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. - 1 Oct., p. 48.

143. JAMES, W.D., ROTH, R.R., 1992, *Skin Microbiology*. In: "Encyclopedia of Microbiology" (Lederberg, J., ed.). Academic Press, Inc., San Diego, p. 23 - 32.
144. JANDA, M.J., ABBOTT, SHARON L., WOODWARD, D., KHASHE, S., 1998, *Invasion of HEp-2 and other eukaryotic cell lines by providenciae: further evidence supporting the role of Providencia alcalifaciens in bacterial gastroenteritis*. Current Microbiology, 37: 159 - 165.
145. JARLIER, V., CATTOEN, C., 1998, *Ecologie microbienne hospitalière*. Bull. Soc. Franc. Microbiol., 13 (3) : 283.
146. JENQ, W., CHEN, C.L., CHANG, C., CRANG, R.F.E., 1994, *Characterization of a major cell wall antigen and potential adhesin in three strains of Candida albicans*. Arch. Microbiol., 162: 33 - 40.
147. JOHNSON, B.F., 1989, *Use of electron microscopy to characterize the surfaces of flocculent and nonflocculent yeasts cells*. Can. J. of Microbiol., 35: 1081-1086.
148. JONES, G.W., *The adhesive properties of Vibrio cholerae and other Vibrio species*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 219 - 249.
149. JONES, G.W., CLEWELL, D.B., CHARLES, L.G., VICKERMAN, M.M., 1996, *Multiple phase variation in haemolytic, adhesive and antigenic properties of Streptococcus gordonii*. Microbiology, 142: 181- 189.
150. JOHNSON, T.R., CASE, CHRISTINE, L., 1998, *Laboratory Experiments in Microbiology*, Benjamin/ Cummings Publ. Comp.
151. JULIEN, R., CENATIEMPO, Y. (red.), *Biotechnologies d'aujourd'hui - Dix domaines stratégiques à l'aube du troisième millénaire*. Pulim Presses de l'Université de Limoges.
152. KARABINIS, A., HILL, C., LECLERCQ, B., TANCREDE, C., BAUME, D., ANDREMONT, A., 1988, *Risk factors for candidemia in cancer patients: a case-control study*. J. of Clin. Microbiol., 26: 426-432.
153. KIL, K.S., DAROUICHE, R.O., HULL, R.A., MANSOURI, M.D., MUSER, D.M., 1997, *Identification of a Klebsiella pneumoniae strain associated with nosocomial urinary tract infection*. J. of Clinical Microbiology, 35: 2370 - 2374.
154. KLOTZ, S.A., HEIM, R.C., SMITH, R.L., ROUSE, J.B., 1994, *The fibronectin adhesion of Candida albicans*. Inf. and Immunity, 62: 4679 - 4681.
155. KNUDSEN, T.B., KLEMM, P., 1998, *Probing the receptor recognition site of the FimH adhesin by fimbriae - displayed FimH-Foc-H hybrids*. Microbiology, 144: 1919-1929.
156. KNOTTON, S., BALDINI, MARY M., KAPER, J.B., McNEISH, A.S., 1987, *Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. Inf. and Immunity, 55: 78 - 85.
157. KNOTTON, S., ADU-BOBIE, JEANNETTE, BAIN, C., PHILLIPS, A.D., DOUGAN, G., FRANKEL, G., 1997, *Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic Escherichia coli adhesion*. Inf. and Immunity, 65 : 1644 - 1652.
158. KOBAYASHI, HIDEMITSU si colab., 1994, *Structural modification of cell wall mannans of Candida albicans serotype A strains grown in yeast extract - Sabouraud liquid medium under acidic conditions*. Infection and Immunity, 62: 968 - 973.
159. KOLENBRANDER, P.E., LONDON, J., 1993, *Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence*. J. of Bacteriology, 175: 3247 - 3252.
160. KOLENBRANDER, P.E., 1993, *Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sci. Public., Oxford., 74: 79S - 86S.
161. KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.A., SCHRECKENBERGER, WINN, Jr., W. C., 1997, *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Fifth Ed., Lippincott, Philadelphia, p. 171 - 252.
162. KOORYK, YVETTE van, FIDGOR, C.G., 1993, *Integrins and integrin regulation*. In: "Lymphocyte adhesion molecules" (Shimizu, Y., ed.). R.G. Landes Comp., Austin, p. 1 - 25.
163. KOZEL, T., 1995, *Virulence factors of Cryptococcus neoformans*. Trends in Microbiology, 3: 295 - 299.
164. KRAUSE, U., THOMSON-CARTER, FIONA M., PENNINGTON, H.T., 1996, *Molecular epidemiology of Escherichia coli O157:H7 by pulsed-field gel electrophoresis and comparison with that by bacteriophage typing*. J. of Clin. Microbiol., 34: 959-961.
165. KRIEG, N.R. (ed. vol. 1), HOLT, J.G. (ed. in chief), 1984, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
166. KRUSE, HILDE, SORUM, H., 1994, *Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments*. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4015- 4021.
167. KURAMITSU, H.K., WONDRAK, LILLIAN, 1983, *Insoluble glucan by Streptococcus mutans serotype C strains*. Inf. and Immunity, 42: 773 - 770.
168. LAZAR, VERONICA, HERLEA, VICTORIA, CANJA, DOINA, 1996, *The influence of antibiotics on in vivo*

- adherence capacity of opportunistic bacteria at inert materials used in stomatology. Abstract Review of XXIst SOMED Congress, Paris, France, 28 - 30 oct. 1996, p. 126.
169. LAZAR, VERONICA, 1997, *Influence of antibiotics on in vitro adherence capacity of some E.coli strains at inert material of catheters*. Bioscience and Microflora (Supplement), Japan Bifidus Foundation, vol 16 (2): 20.
 170. LAZAR, V., HERLEA, V., BULAI, D., CIOLAC-RUSSU, A., 1998, *Studiul frecvenței tulpinilor de enterobacterii rezistente la antibiotice la bolnavi spitalizați*. Analele Universității din București, Secția Biologie, XLVII, p. 69-78.
 171. LAZAR, VERONICA, BULAI, DOINA, LOGOJAN, ANAMARIA, BALOTESCU, CARMEN, MORARU, ANCA, HERLEA, VICTORIA, 1998, *The influence of certain environmental factors on in vitro adherence capacity at inert material of catheters of some E. coli strains*. Abstract Review of 2nd World Congress of Anaerobic Bacteria and Infections, Nice, France, 3 - 6 oct. 1998, p. 18.
 172. LAZAR, VERONICA, 1999, *Study of the adhesion and invasion capacity of some opportunistic enterobacteria strains to Caco-2 cell line*. Abstract Review of 24th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, San Francisco U.S.A., 23 - 25 sept. 1999, p. 48.
 173. LAZAR, V., HERLEA, V., BULAI, D., CIOLAC-RUSSU, A., MORARU, A., CERNAT, R., VADINEANU, E., 1999, *A comparative study of the frequency of enterobacteria strains showing drug resistance from healthy and hospitalized people*. Abstract Review of 24th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, San Francisco, U.S.A., 23 - 25 sept. 1999, p. 49.
 174. LAZAR, VERONICA, 1999, *A quantitative method to determine the adhesion and invasion capacity of some opportunistic enterobacteria strains to an intestinal cell line*. Analele Universității din București, Secția Biologie, XLVIII (sub tipar).
 175. LAZAR, VERONICA, HERLEA, VICTORIA, BULAI, DOINA, CIOLAC-RUSSU, ANCA, CERNAT, RAMONA, 1999, *Some aspects related with health risk for human carriers of antibiotic resistant enterobacteria strains*. Analele Universității din București, Secția Biologie, XLVIII (under press).
 176. LAZAR, VERONICA, IONESCU, D. M., DIMA, V.F., HERLEA, VICTORIA, COMAN, NICULINA, NITU, GEORGETA, ZARNEA, G., 2000, *Ultrastructural aspects of the interaction between some opportunistic enterobacteria strains selected for adhesive properties on a cellular substratum and the peritoneal rat macrophages*. Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. - 1 Oct., p. 37.
 177. LAZAR, VERONICA, BEZIRTZOGLU, EUGENIA, HERLEA, VICTORIA, IONESCU, D.M., PETRASINCU, DOINA, TATU, DORINA, CERNAT, RAMONA, 2000, *Characterization of the interaction of some opportunistic adherent enterobacteria strains with HEp-2 cells - ultrastructural aspects*. Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. - 1 Oct., p. 38.
 178. LAZAR, VERONICA, BEZIRTZOGLU, EUGENIA, HERLEA, VICTORIA, PETRASINCU, DOINA, MORARU, ANCA, BULAI, DOINA, ILINA, LUCIA, TACHE, ELENA, 2000, *Influence of anaerobic bacteria on the adhesion and invasion capacity of some E. coli strains to cellular substrata*. Abstract Review of 25th SOMED Congress of Microbial Ecology and Disease, Bucharest, 29 Sept. - 1 Oct., p. 39.
 179. LAZAR, VERONICA, 2000, *Implicații teoretice și practice ale fenomenelor de aderență și agregare microbiană* (Teza de doctorat - Academia Română. Institutul de Biologie București), București.
 180. LANDRAUD, L., GAUTHIER, M., FOSSE, T., BOQUET, P., 2000, *Frequency of Escherichia coli strains producing the cytotoxic necrotizing factor (cnf1) in nosocomial urinary tract infections*. Letters in Appl. Microbiol., 30: 213 - 216.
 181. LANGE, B., CIOPRAGA, JEANA, BERGSTRÖM, J., MOTAS, CECILIA, KARLSSON, K.-A., 1994, *Binding of the galactose-specific Pseudomonas aeruginosa lectin, PA-I, to glycosphingolipids and others glycoconjugates*. Glycoconjugate Journal, 11: 292 - 298.
 182. LANGERMANN, S., PALASZYNSKI, S., BARNHART, M., AUGUSTE, G., PINKNER, J.S., BURLEIN, J., BARREN, P., KOENIG, S., LEATH, S., JONES, C.H., HULTGREN, S.J., 1997, *Prevention of mucosal Escherichia coli infection by FimH - adhesin - based systemic vaccination*. Science, 276: 607 - 611.
 183. LAW, D., 1994, *Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic Escherichia coli*. Clinical Microbiol. Rev., 7: 152 - 173.
 184. LAW, D., CHART, H., 1998, *Enterocoaggregative Escherichia coli*. J. of in Appl. Microbiol., 84: 685 - 697.
 185. LAW, D., 2000, *A review: virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E. coli*. J. of Appl. Microbiol., 88: 729 - 745.
 186. LEDERBERG, J. (ed.), 1992, *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press Inc., San Diego, California.
 187. LEE, J.C., KING, R., 1983, *Adherence mechanisms of Candida albicans*. In: "Microbiology - 1983 - Mechanisms of pathogenesis". (Schlessinger, D., ed.), Amer. Soc. for Microbiol., Washington. D.C., p. 269 - 272.
 188. LEVINE, M.M., PRADO, VALERIA, ROBINS-BROWNE, R., LIOR, H., KAPER, J.B., MOSELEY, S.L.,

- GICQUELAIS, KAREN, NATARO, J.P., VIAL, P., TALL, B., 1988, *Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic Escherichia coli*. J. of Inf. Diseases, **158**: 224 - 228.
189. LEVINSON, W., JAWETZ, E., *Medical Microbiology and Immunology*. Sixth. Ed., McGraw Hill Comp., Inc., New -York.
190. LEVY, S.B., 1992, *The antibiotic paradox: How miracle drugs are destroying the miracle*. Ed. Plenum Press, N.Y., p. 53-104.
191. LIVRELLI, VALERIE, DE CHAMPS, C., DI MARTINO, P., DARFEUILLE-MICHAUD, ARLETTE, FORESTIER, CHRISTIANE, JOLY, B., 1996, *Adhesive properties and antibiotic resistance of Klebsiella, Enterobacter and Serratia clinical isolates involved in nosocomial infections*. J. of Clin. Microbiol., **34**: 1963 - 1969.
192. LOPEZ-RIBOT, J.-L., La JEAN CHAFFIN, W., 1994, *Binding of extracellular matrix component entactin to Candida albicans*. Inf. and Immunity, **62**: 4564 - 4571.
193. LOPEZ-RIBOT, J.-L., Mc VAY, C.S., La JEAN CHAFFIN, W., 1994, *Murine tissues exposed to cytotoxic drugs display altered patterns of Candida albicans adhesion*. Inf. and Immunity, **62**: 4226 - 4232.
194. LOOMIS, W.F., 1983, *Genetic analysis of cell adhesion*. Developmental Genetics, **4**: 61 - 68.
195. MADISON, BERENEICE, OFEK, I., CLEGG, S., ABRAHAM, S.N., 1994, *Type 1 fibrillar shafts of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae influence sugars - binding specificities of their FimH adhesins*. Inf. and Immunity, **62**: 843 - 848.
196. MAKIN, S.A., BEVERIDGE, T.G., 1996, *The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of Pseudomonas aeruginosa to surfaces*. Microbiology, **142**: 299 - 307.
197. MANEFIELD, M., de NYS, R., KUMAR, N., READ, R., GIVSKOV, M., STEINBERG, P., KJELLEBERG, S., 1999, *Evidence that halogenated furanones from Delisea pulchra inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein*. Microbiology, **145**: 283 - 291.
198. MANJAREZ-HERNANDEZ, H.A., BALDWIN, T.J., WILLIAMS, P.H., HAIGH, R., KNUTTON, S., AITKEN, A., 1996, *Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic Escherichia coli infection*. Inf. and Immunity, **64**: 2368 - 2370.
199. MARCHESE, A., DEBBIA, E.A., MASSARO, S., CAMPORA, U., SCHITO, G., 1996, *Brodinoprim effects of subliminal inhibitory concentrations on virulence traits of respiratory and urinary tract pathogens and on plasmid transfer and stability*. J. of Chemotherapy, **8**: 171 - 177.
200. MARCUS, HILDA, AUSTRIA, AL, BAKER, N.R., 1989, *Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal epithelium*. Inf. and Immunity, **57**: 1050 - 1053.
201. MARSHALL, K.C., 1984, *Microbial adhesion and aggregation*. Springer Verlag, Berlin.
202. MATHEWSON, J.J., OBERHELMAN, R.A., DUPONT, H.L., De La CABADA, J., GARIBAY, E.V., 1987, *Enteroadherent Escherichia coli as a cause of diarrhea among children in Mexico*. J. of Clin. Microbiol., **25**: 1917 - 1919.
203. MATTHEWS, K.R., MURDOUGH, P.A., BRAMLEY, A.J., 1997, *Invasion of bovine epithelial cells by verocytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7*. J. of Appl. Microbiology, **82**: 197 - 203.
204. McCOURTIE, JANE, DOUGLAS, JULIA L., 1981, *Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources*. Inf. and Immunity, **32**: 1234 - 1241.
205. Mc FARLAND, L.V., 1993, *Biotherapeutic agents: boon or bane?* Soc. for Microbial Ecology and Disease, Annual Meeting, Boston, U.S.A. (Abstracts book), p. 38.
206. Mc GROARTIE, J.A., 1993, *In vitro inhibition of growth and adhesion of Candida albicans by vaginal isolates lactobacilli*. Soc. for Microbial Ecology and Disease, Annual Meeting, Boston, U.S.A. (Abstracts book), p.39.
207. MENDONCA, AUBREY F., AMOROSO, T.L., KNABEL, S.J., 1994, *Destruction of Gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane*. Appl. and Environ. Microbiol., **60**: 4009 - 4014.
208. MEYER, D.H., FIVES-TAYLOR, P.M., 1994, *Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells*. Inf. and Immunity, **62**: 928 - 935.
209. McGINNIS, M.R., 1980, *Laboratory handbook of medical micology*. Academic Press, Inc., New York.
210. MICHALEK, SUZANNE M., CHILDERS, N.K., DERTZBAUGH, M.T., 1995, *Vaccination strategies for mucosal pathogens*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., 269-301.
211. MIMS, C.A., PLAYFAIR, J.H.L., ROITT, I.M., WAKELIN, D., WILLIAMS, ROSAMUND, 1998, *Medical Microbiology*. Sec. Ed., Mosby International Limited, London.
212. MINTZ, K.P., FIVES-TAYLOR, PAULA M., 1994, *Adhesion of Actinobacillus actinomycetemcomitans to a*

- human oral cell line. *Inf. and Immunity*, **62**: 3672 – 3678.
213. MOBLEY, H. L.T., 2000, *Escherichia coli and Proteus mirabilis exhibit distinct mechanisms of pathogenesis when causing urinary tract infections*. *ASM News*, **66**: 403 – 410.
 214. MOORE, W.E.C., MOORE, LILLIAN H., 1995, *Intestinal Floras of Populations That Have a High Risk of Colon Cancer*. *Appl. and Environ. Microbiology*, **61**: 3202 – 3207.
 215. MOUTON, C., BILAK, R., MICHAILESCO, P., VALCARCEL, J., 1999, *Les biofilms bactériens de la cavité buccale*. In : « Les biofilms (2) ». *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **14**: 112-120.
 216. MOYEN, E.N., BONNEVILLE, F., FAUCHERE, J.L., 1986, *Modification par l'érythromycine et un extrait de Lactobacillus acidophilus de la colonisation de l'intestin et de la translocation de Campylobacter jejuni chez le souris axénique*. *Ann. Inst. Pasteur - Microbiologie*, **137 A**: 199 - 207.
 217. MÜHL DORFER, INGE, HACKER, J., 1994, *Genetic aspects of Escherichia coli virulence*. *Microbial Pathogenesis*, **16** : 171 - 181.
 218. MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GILMORE, M., 2000, *Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance*. *Clinical Microbiol. Rev.*, **13**: 513-522.
 219. MURRAY, P.R., 1998, *Pocket Guide to Clinical Microbiology*. 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
 220. NATARO, J.P., KAPER, J.B., 1998, *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews*, **11**: 142 – 201.
 221. NEGUT, M., BUIUC, D., 1999, *Identificarea bacililor gram-negativi aerobi glucozofermentativi*. In: « *Tratat de microbiologie clinica* » (Buiuc, D., Negut, M., red.), Editura Medicala, Bucuresti, p. 698 – 757.
 222. NEU, T.R., 1996, *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces*. *Microbiological Reviews*, **60**: 151-166.
 223. NICHOLS, W.W., 1989, *Susceptibility of biofilms to toxic compounds*. In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 321 - 331.
 224. NICOLETTI, M., SUPERTI, FABIANA, CONTI, CINZIA, CALCONI, A., ZAGAGLIA, C., 1988, *Virulence factors of lactose-negative Escherichia coli strains isolated from children with diarrhea in Somalia*. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 524 – 529.
 225. NIEDERMAN, M.S., 1989, *Bacterial adherence as a mechanism of airway colonization*. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**: 15-20.
 226. NOVEL, G., 1999, *Les Biofilms (2)*. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, **14 (2)**: 103-126.
 227. ODDS, F.C., 1994, *Candida species and virulence*. *ASM News*, **60**: 313-318.
 228. OFEK, I., BEACHEY, E.H., 1980, *General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 1-29.
 229. OFEK, I., DOYLE, R.J., 1994, *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Chapman and Hall, Inc., New-York.
 230. OGAWA, T., 1994, *The potential protective immune responses to synthetic peptides containing conserved epitopes of Porphyromonas gingivalis fimbrial protein*. *J. Med. Microbiol.*, **41**: 349 - 358.
 231. OLSEN, A., YONSSON, ANNA, NORMAK, S., 1989, *Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli*. *Nature, London*, **338**: 652 – 655.
 232. *** *The Oxoid Manual of Culture Media, Ingredients and other Laboratory Services*. Fifth ed. (1982), Publ. by Oxoid Ltd., U.K.
 233. PALENIK, B., BLOCK, J.-C., BURNS, R.-G., CHARACKLIS, W.G., CHRISTENSEN, B.E., GHIORE, W.G., GRISTINA, A.G., MOREL, F.M.M., NICHOLS, W.W., TUOVINEN, O.H., TUSCHEWITZKI, G.-J., VIDELA, H.A., 1993, *Biofilms: properties and processes*. In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 351 – 366.
 234. PASSADOR, L., IGLEWSKI, BARBARA, 1995, *Quorum sensing and virulence gene regulation in Pseudomonas aeruginosa*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. II. Bacterial adaptation to extracellular environments" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 65 – 78.
 235. PATRICK, S., LARKIN, M.J., 1995, *Immunological and molecular aspects of bacterial virulence*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.
 236. PECQUET, S., GUILLAUMIN, D., TANCREDE, C., ANDREMONT, A., 1991, *Kinetics of Saccharomyces cerevisiae elimination from the intestines of human volunteers and effect of this yeast on resistance to microbial colonization in gnotobiotic mice*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, **57**: 3049-3051.
 237. PEARCE, W.A., BUCHANAN, T.M., 1980, *Structure and cell membrane-binding properties of bacterial fimbriae*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 289 – 344.
 238. PEITZ, U., MALFERTHEINER, P., 1999, *Helicobacter pylori infection*. *Karger Gazette*, No. **63**: 1 – 4.
 239. PETER, J., 1996, *Use and Interpretation Tests in Infectious Disease*. Fourth Edition, Specialty Laboratories, Santa Monica, p. 332-334.

240. PETIT, LAETITIA, GILBERT, MARYSE, POPOFF, M.R., 1999, *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. Trends in Microbiology, 7: 104 – 110.
241. PHILLIPS, D.R., GARTNER, T.K., 1980, *Cell recognition systems in eukaryotic cells*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 399 – 438.
242. PICARDEAU, M., VINCENT, VERONIQUE, 1998, *Mycobacterial linear plasmids have an invertron-like structure related to other linear replicons in actinomycetes*. Microbiology, 144: 1981 – 1988.
243. PIER, G.B., Des JARDIN, D., GROUT, M., GARNER, C., BENNETT, S.E., PEKOE, G., FULLER, S.A., THORNTON, M.O., HARKONEN, S.W., MILLER, C.H., 1994, *Human immune response to Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolysaccharide (alginate) vaccine*. Inf. and Immunity, 62: 3972 – 3979.
244. POINDEXTER, JEANNE S., 1987, *Bacterial responses to nutrient limitation*. In: "Ecology of Microbial Communities" (Fletcher, M., Gray, T.R.G., Jones, J.G., eds.), The 41th Symposium of The Society for General Microbiology, Cambridge Univ. Press, Cambridge, p.283 – 317.
245. POSTNOVA, TATYANA, GOMEZ-DUARTE, O.G., RICHARDSON, KATHLEEN, 1996, *Motility mutants of Vibrio cholerae O1 have reduced adherence in vitro to human small intestinal epithelial cells as demonstrated by ELISA*. Microbiology, 142: 2767 – 2776.
246. POXTON, I.R., 1993, *Prokaryote envelope diversity*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford, 74: 1S – 11S.
247. PRIGENT-COMBARET, CLAIRE, LEJEUNE, P., 1999, *La génétique de la formation du développement des biofilms*. In : « Les biofilms (2) », Bull. Soc. Fr. Microbiol., 14: 121-126.
248. QUESNEL, L.B., GILBERT, P., HANDLEY, PAULINE S. (eds.), 1993, *Microbial cell envelopes: interactions and biofilms*. Soc. for Applied Bacteriology Symposium. Suppl. to J. of Appl. Bacteriology 74, Blackwell Sciet. Public., Oxford.
249. RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., TANCREDE, C., 1977, *L'effet de barrière microbienne dans le tube digestif: Moyen de défense de l'hôte contre les bactéries exogènes*. Medecine et Maladies Infectieuses, 7: 130-134.
250. RAUTELIN, H., KIHLMSTROM, E., JURSTRAND, MARGARETHA, DANIELSSON, D., 1995, *Adhesion to and invasion of HeLa cells by Helicobacter pylori*. Zbl. Bakt., 282: 50-53.
251. REID, G., SOBEL, J.D., 1987, *Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review*. Reviews of Inf. Diseases, 9: 470 – 487.
252. REINHEIMER, J.A., DEMKOW, M.R., CANDIOTI, M.C., 1990, *Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures*. The Australian J. of Dairy Technology, May, 5 – 8.
253. *** REMEL Product Technical Manual, 1993, Edited by Remel Concern, Lenexa, Kansas.
254. RIPPON, J.W., 1982, *Medical micology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Sec. ed., W.B. Saunders Comp., Philadelphia.
255. RITTIG, M.G., SCHROPPEL, K., SEACK, K.-H., SANDER, U., N'DIAYE, E.-N., PARINI-MARIDONNEAU, I., SOLBACH, W., BOGDAN, C., 1998, *Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells*. Inf. and Immunity, 66: 4331 – 4339.
256. RITTMAN, B.E., 1993, *Detachment from biofilms*. In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 49 – 58.
257. ROBINSON, A., MELING, J., 1993, *Envelope structure and the development of new vaccines*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford, 74: 43S – 51S.
258. ROGERS, JULIE, DOWSETT, A.B., DENNIS, P.J., LEE, J.V., KEEVIL, C.W., 1994, *Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora*. Appl. and Environ. Microbiol. 60: 1585 – 1592.
259. ROITT, I.M., 1991, *Essential Immunology*. Sec. ed., Blackwell, Scient. Publ., Oxford, 2 – 64.
260. ROMLING, UTE, BIAN, Z., HAMMAR, M., SIERRALTA, W.D., NORMARK, S., 1998, *Curli fibers are highly conserved between Salmonella typhimurium and Escherichia coli with respect to operon structure and regulation*. J. of Bacteriology, 180: 722 – 731.
261. ROSE, A.H., HARRISON, J.S. (Eds.), 1987, *The Yeasts*. Sec. Ed., Acad. Press. Inc., London.
262. ROSENBERG, E., 1993, *Biofilms on water-insoluble substrates*. In: "Structure and function of biofilms" (Characklis, W.G., Wilderer, P.A., eds.), John Wiley & Sons Ltd., Dahlem Konferenzen, p. 59 – 71.
263. ROSENSHINE, I., RUSCHKOWSKI, SHARON, FINLAY, B.B., 1996, *Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic Escherichia coli depends on growth phase, temperature and protein synthesis upon contact with epithelial cells*. Inf. and Immunity, 64: 966 – 973.

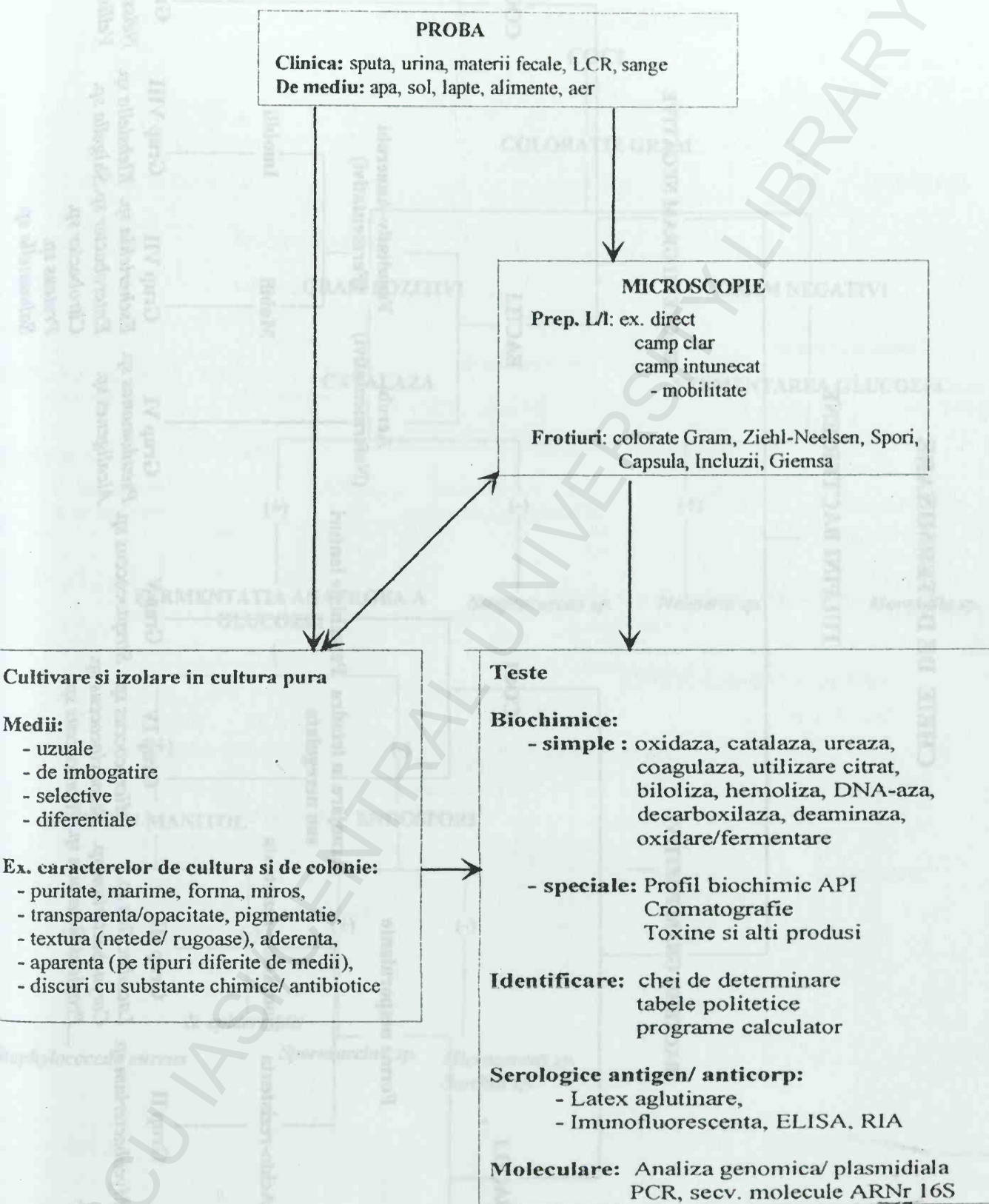
264. ROTH, J.A., BOLIN, CAROLE A., BROGDEN, KIM A., MINION, F.C., WANNEMUEHLER, M.J. (eds), 1995, *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C.
265. ROTROSEN, D., CALDERONE, R.A., EDWARDS Jr., J.E., 1986, *Adherence of Candida species to host tissues and plastic surfaces*. Reviews of Inf. Diseases, **8**: 73-85.
266. RUSSO, T.A., WENDEROTH, SUZANNE, CARLINO, U.B., MERRICK, J.M., LESSE, A., 1998, *Identification, genomic organization and analysis of the group III capsular polysaccharide genes kpsD, kpsM, kpsT, and kpsE from an extraintestinal isolate of Escherichia coli (CP9, O4/K54/H5)*. J. of Bacteriology, **180**: 338 – 349.
267. SALAM KHAN, A., SCHIFFERLI, D.M., 1994, *A minor 987P protein different from the structural fimbrial subunit is the adhesin*. Inf. and Immunity, **62**: 4233 – 4243.
268. SALIT, I., VAVOUGIOUS, J., HOFMANN, T., 1983, *Isolation and characterization of Escherichia coli pili from diverse clinical sources*. Inf. and Immunity, **42**: 755– 762.
269. SALYERS, ABIGAIL, WHITT, DIXIE, 1994, *Bacterial pathogenesis – a molecular Approach*. ASM Press, Washington, D.C., p. 190 – 204.
270. SAMARANAYAKE, Y.H., SAMARANAYAKE, L.P., 1994, *Candida krusei: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen*. J. Med. Microbiol., **41**: 295-310.
271. SAMARANAYAKE, Y.H., WU, P.C., SAMARANAYAKE, L.P., SO, M., YUEN, K.J., 1994, *Adhesion and colonization of Candida krusei on host surfaces*. J. Med. Microbiol., **41**: 251 – 258.
272. SAUNDERS, J.R., O'SULLIVAN, HELEN, WAKEMAN, JANE, SIMS, GAIL, HART, C.A., VIRJI, M., HECKELS, J.E., WINSTANLEY, C., MORGAN, J.A.W., PICKUP, R.W., 1993, *Flagella and pili as antigenically variable structures on the bacterial surfaces*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74**: 33S – 42S.
273. SAVAGE, D.C., 1980, *Adherence of normal flora to mucosal surfaces*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman & Hall, London, p. 31 – 59.
274. SAVAGE, D.C., 1984, *Activities of microorganisms attached to living surfaces*. In: "Microbial adhesion and aggregation" (Marshall, K.C., ed.), Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, p. 233 – 249.
275. SCALETSKY, ISABEL C.A., SILVA, LOURDES M., TRABULSI, L.R., 1984, *Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells*. Inf. and Immunity, **45**: 534 – 536.
276. SCHURTZ, TRICIA A., HORNICK, D.B., KORHONEN, T.K., CLEGG, S., 1994, *The type 3 fimbrial adhesin gene (mrkD) of Klebsiella species is not conserved among all fimbriate strains*. Inf. and Immunity, **62**: 4186 – 4191.
277. SEBGHATI, T.A.S., KORHONEN, T.K., HORNICK, D.B., CLEGG, S., 1998, *Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of Klebsiella strains*. Inf. and Immunity, **66** : 2887 – 2894.
278. SENET, J.- M., 1995, *Phénomènes d'adhérence et molécules impliquées dans l'interaction entre la levure Candida et son hôte*. Bull. Soc. Fr. Microbiol., **10**: 279 - 283.
279. SERKIN, CARLA D., SEIFERT, S.H., 1998, *Frequency of pilin antigenic variation in Neisseria gonorrhoeae*. J. of Bacteriology, **180**: 1955 – 1958.
280. SHANSON, D.C., 1999, *Microbiology Clinical Practice*. Third Ed., Butterworth Heinemann, Oxford.
281. SHARON, N., LIS, H., 1993, *Carbohydrates in cell recognition*. Scient. Amer., Jan., 74 – 81.
282. SINGLETON, P., SAINSBURY, D., 1997, *Dictionary of microbiology and molecular biology*. Sec. Ed., John Wiley & Sons, Chichester, U.K.
283. SLEYTR, U.B., MESSNER, P., PUM, D., SARA, M., 1993, *Crystalline bacterial cell surface layers: general principles and application potential*. J. of Appl. Bacteriology Symposium Suppl.: "Microbial cell envelopes: interactions and biofilms" (Quesnel, L.B., Gilbert, P., Handley, Pauline S., eds.), Blackwell Sciet. Public., Oxford., **74**: 21S – 32S.
284. SMITH, H., 1995, *The state and future of studies on bacterial pathogenicity*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. VI. Past, present and future studies." (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., P. 335 – 357.
285. SOARES, E.V., TEIXEIRA, J.A., MOTA, M., 1992, *Interaction between flocculent and nonflocculent cells of Saccharomyces cerevisiae*. Can. J. Microbiol., **38**: 969 - 974.
286. SOUSSY, C. J. (coord.), 1997, *Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Bull. Soc. Fr. de Microbiologie, **12 (4)**: 369-371.
287. SOUSSY, C. J. (coord.), 1999, *Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*, Bull. Soc. Fr. de Microbiologie, p. 17-21.
288. SPOTL, L., MOST, J., DIERICH, M.V., 1994, *Ca ions stabilize the binding of complement factor iC3b to pseudohyphal form of Candida albicans*. Inf. and Immunity, **62**: 1225 – 1227.
289. STADDON, W., TODD, T., IRVIN, R.T., 1990, *Equilibrium analysis of binding of Candida albicans to human*

- buccal epithelial cells*. Can. J. of Microbiol., 36: 336 - 340.
290. STORDEUR, P., CHINA, B., CHARLIER, G., ROELS, S., MAINIL, J., 2000, *Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O 118 enterohaemorrhagic Escherichia coli in neonatal calves*. Microbes and Infection, 2: 17 - 24.
291. STOUT, R.D., LI, Y., MILLER, A.R., LAMBE, JR., DWIGHT, W., 1994, *Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E₂ and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production*. Inf. and Immunity, 62: 4160 - 4166.
292. SUMMANEN, PAULA, BARON, ELLEN JO, CITRON, DIANE, STRONG, CATHERINE A., WEXLER, H. M., FINEGOLD, S.M., 1993, *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*. Star Publishing Comp., Belmont, California, 33 - 37.
293. SVENSSON, M., LINDSTEDT, R., RADIN, N.S., SVANBORG, C., 1994, *Epithelial glucosphingolipid expression as a determinant of bacterial adherence and cytokine production*. Inf. and Immunity, 62: 4404-4410.
294. SWARTLEY, J.S., LIU, LI-JUN, MILLER, Y.K., MARTIN, L.E., EDUPUGANTI, SRILATHA, STEPHENS, D.S., 1998, *Characterization of the gene cassette required for biosynthesis of the (α -1 $\rightarrow$ 6)-linked N-acetyl-D-Mannosamine-1-phosphate capsule of serogroup A Neisseria meningitidis*. J. of Bacteriology, 180: 1533 - 1539.
295. TANCREDE, C., AZIZI, P., RAIBAUD, P., DUCLUZEAU, R., 1977, *Conséquences de la destruction des barrières écologiques de la flore du tube digestif par les antibiotiques. Perturbations des relations entre l'hôte et les bactéries potentiellement pathogènes*. Médecine et Maladies Infectieuses, 7 : 145 - 149.
296. TANCREDE, C., 1989, *Flore intestinale et pathologie infectieuse humaine*. Rev. Sc. Tech. Off. int. Epiz., 8: 405 - 415.
297. TANCREDE, C., 1992, *Role of human microflora in health and disease*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11: 1012 - 1016.
298. TARKKANEN, A.M., VIRKOLA, R., CLEGG, S., KORHONEN, T.K., 1997, *Binding of the type 3 fimbriae of Klebsiella pneumoniae to human endothelial and urinary bladder cells*. Inf. and Immunity, 65: 1546 - 1549.
299. TEMPORADO COOKSON, SUSAN, NATARO, J.P., 1996, *Characterization of Hep-2 cell projection formation induced by diffusely adherent Escherichia coli*. Microbial Pathogenesis, 21: 421 - 434.
300. TEWARI, R., IKEDA, T., MALAVIYA, R., Mac GREGOR, JENNIFER I., LITTLE, R.J., HULTGREN, S.J., ABRAHAM, S.N., 1994, *The PapG adhesin of P fimbriae protects Escherichia coli from neutrophil bactericidal activity*. Inf. and Immunity, 62: 5296 - 5304.
301. THOMSON, R.C. A., 2001, *The future impact of societal and cultural factors on parasitic disease - some emerging issues*. Int. J. Parasitol., 949 - 959.
302. THORNS, C.J., BELL, M.M., SOJKA, MARCIANNA G., NICHOLAS, R.A., 1996, *Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella enteritidis infections in chickens based on antibodies to SEF 14 fimbrial antigen*. J. of Clin. Microbiol., 34: 792 - 797.
303. THORNSBERRY, C., TOMFOHRDE, K., SAHM, D., 1997, *Antibiotic Surveillance Studies: Clinical Utility*. Report at the Symposium Immediately Preceding the 35th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America, San Francisco, U.S.A.
304. TOMA, N., 1989, *Citologia drojdiilor*. In : Biologia si tehnologia drojdiilor - Vol. I (Anghel, I., coord.). Editura Tehnica, Bucuresti, p. 13 - 21.
305. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, CHRISTINE, L., 1986, *Microbiology: An introduction*. Sec.ed., The Benjamin/Cummings Publish. Comp., Inc., Menlo Park, California, p. 82 - 83, 199.
306. TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, CHRISTINE, L., 1998, *Microbiology: An introduction*. Sixth ed., The Benjamin/Cummings Publish. Comp., Inc., Menlo Park, California, p. 423 - 431.
307. TRUCKSIS, M., 2000, *Fishing for mycobacterial virulence genes: a promising animal model*. ASM News, 66: 668 - 674.
308. TUNNEY, M.M., GORMAN, S.P., PATRICK, S., 1996, *Infections associated with medical devices*. Reviews in Med. Microbiol., 7 (4): 195-205.
309. TUNNEY, M.M., JONES, D.S., GORMAN, S.P., 1997, *Methacrylate polymers and copolymers as urinary tract biomaterials: resistance to encrustation and microbial adhesion*. Intern. J. of Pharmaceutics, 151: 121-126.
310. VASSU, TATIANA, STOICA, ILEANA, CSUTAK, ORTANSA, MUSAT, F., 2001. *Genetica microorganismelor si inginerie genetica microbiana - Note de curs si tehnici de laborator*. Ed. Petron, Bucuresti
311. VIRJI, M., 1996, *Microbial utilization of human signalling molecules*. 142: 3319 - 3336.
312. VIZITIU, OLIVIA, 1995, *Diagnosticul de laborator al legionelozelor*. Bacteriologia, Virusologia, Parazitologia, Epidemiologia, 40: 59 - 67.
313. WAI, S.N., MIZUNOE, Y., TAKADE, A., KAWABATA, S.-I., YOSHIDA, S.-I., 1998, *Vibrio cholerae O1*

- strain TSI-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. *Appl. Environmental Microbiol.*, **64**: 3648 – 3655.
314. WARREN, NANCY G., SHADOMY, H.J., 1991, *Yeasts of Medical Importance*. In: "Manual of Clinical Microbiology", 5th ed. (Balows, ed.), Amer. Soc. for Microbiology, Washington D.C., p. 617 -630.
 315. WATT, P.J., WARD, M.E., 1980, *Adherence of Neisseria gonorrhoeae and other Neisseria species to mammalian cels*. In: *Bacterial adherence: Receptors and recognition* (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 251-288.
 316. WEYANT, R.S., MOSS, C.W., WEAVER, R.E., HOLLIS, D.G., JORDAN, J.G., COOK, E.C., DANESHVAR, M.I., 1996, *Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic Bacteria*. Second Ed., Williams & Wilkins, Baltimore, p. 25 - 32.
 317. WICHEN, A.J., 1980, *Structure and cell membrane binding properties of bacterial lipoteichoic acids and their possible role in adhesion of streptococci to eukariotic cells*. In: "Bacterial adherence: Receptors and recognition" (Beachey, E.H., ed.). Series B, vol. 6, Chapman and Hall, London, p. 137 - 158.
 318. WIELER, L.H., VIELER, E., ERPENSTEIN, C., SCHLAPP, T., STEINRUCK, H., BAUERFEIND, R., BYOMI, A., BALJER, G., 1996, *Shiga toxin-producing Escherichia coli strains from bovines: association of adhesion with carriage of eae and other genes*. *J. of Clin. Microbiol.*, **34**: 2980 – 2984.
 319. WILSON, K.H., 1995, *Ecological concepts in the control of pathogens*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens. Cap. V. Strategies to overcome bacterial virulence mechanisms" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., . 245 – 256.
 320. XU, KAREN D., STEWARD, P.S., XIA, FUHU, HUANG, C.-T., McFETERS, G.A., 1998, *Spatial physiological heterogeneity in Pseudomonas aeruginosa biofilm is determined by oxygen availability*. *Appl. Environmental Microbiol.*, **64**: 4035 – 4039.
 321. YASUDA, H., AJIKI, Y., AOYAMA, J., YOKOTA, T., 1994, *Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in vitro bacterial biofilms model*. *J. Med. Microbiol.*, **41**: 359 - 367.
 322. ZARNEA, G., 1983, *Tratat de microbiologie generala*. vol. I, Edit. Academiei, Bucuresti.
 323. ZARNEA, G., 1984, *Tratat de microbiologie generala*. vol. II, Edit. Academiei, Bucuresti.
 324. ZARNEA, G., 1986, *Tratat de microbiologie generala*. vol. III, Edit. Academiei, Bucuresti.
 325. ZARNEA, G., 1990, *Tratat de microbiologie generala*. vol. IV, Edit. Academiei, Bucuresti.
 326. ZARNEA, G., 1994, *Tratat de microbiologie generala*. vol. V, Edit. Academiei, Bucuresti.
 327. ZIERLER, M.K., GALAN, J.E., 1995, *Paradigms in bacterial entry into host cells*. In: "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens". Cap. I. „Bacterial adherence, colonization and invasion on mucosal surfaces" (Roth, J.A., Bolin, Carole A., Brogden, Kim A., Minion, F.C., Wannemuehler, M.J. eds.). Sec. Ed., ASM Press, Washington, D.C., p. 21 – 31.

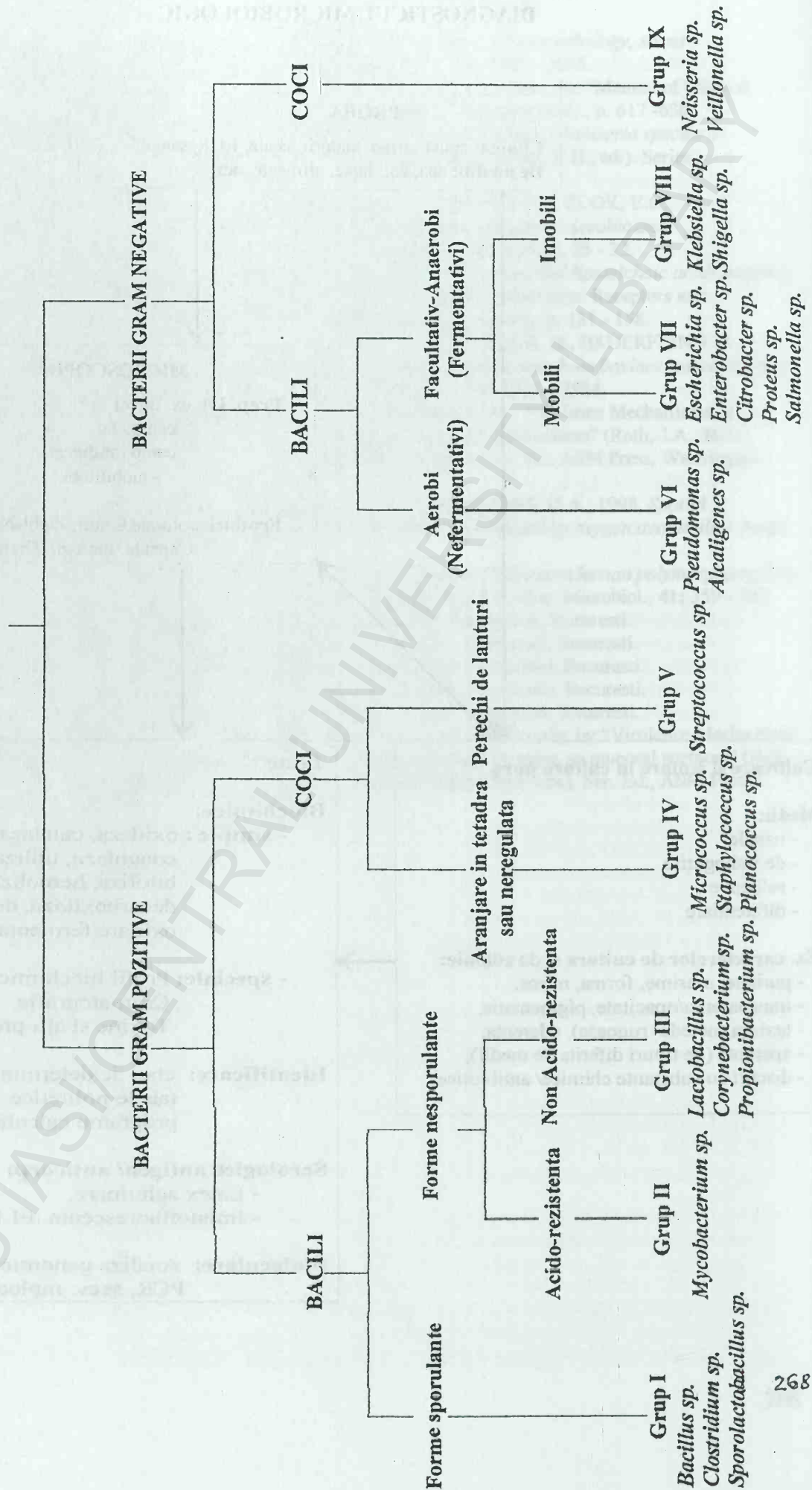
*

ETAPELE IDENTIFICARII AGENTILOR PATOGENI DIAGNOSTICUL MICROBIOLOGIC

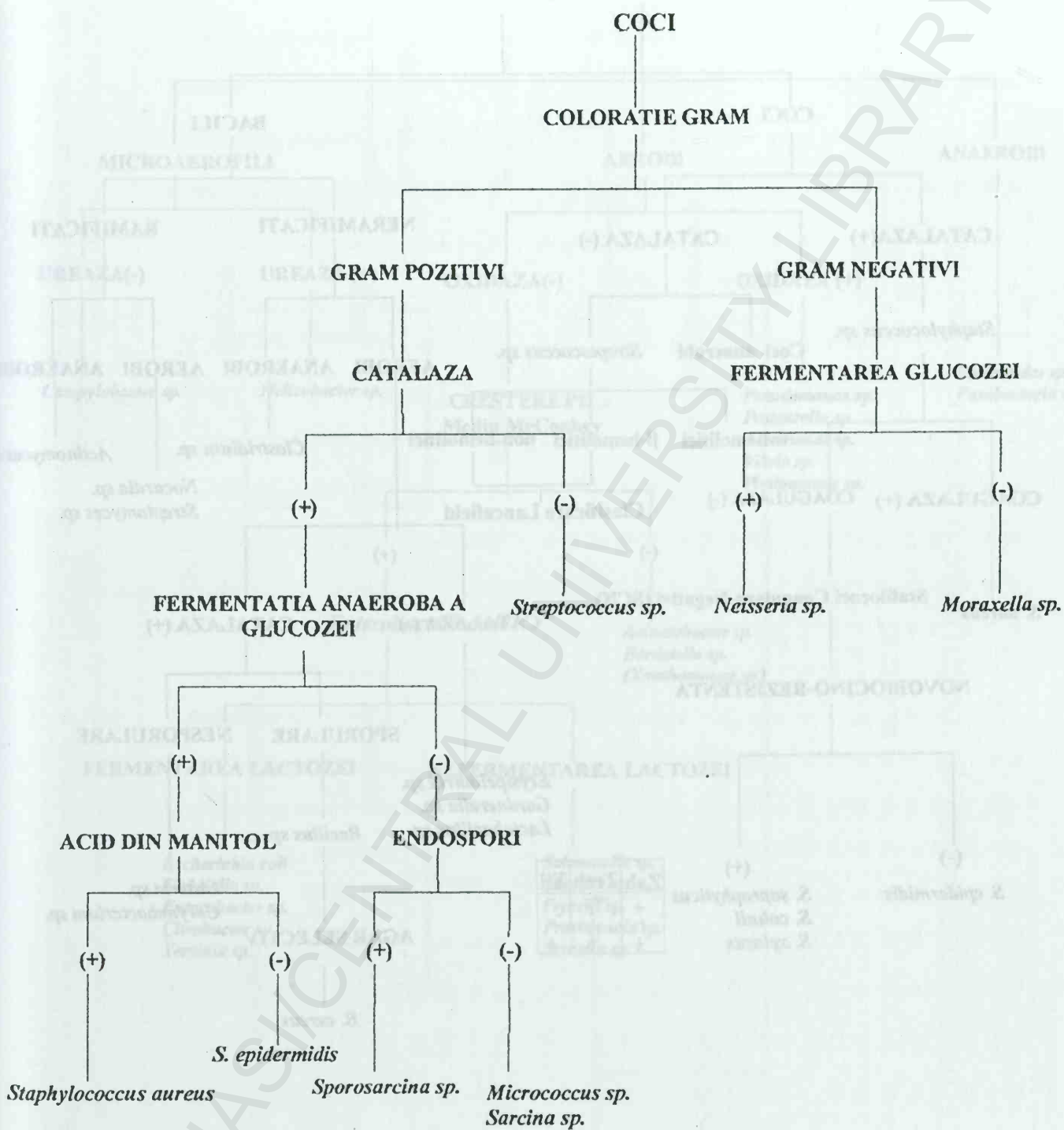


CHEIE DE DETERMINARE

TULPINI BACTERIENE

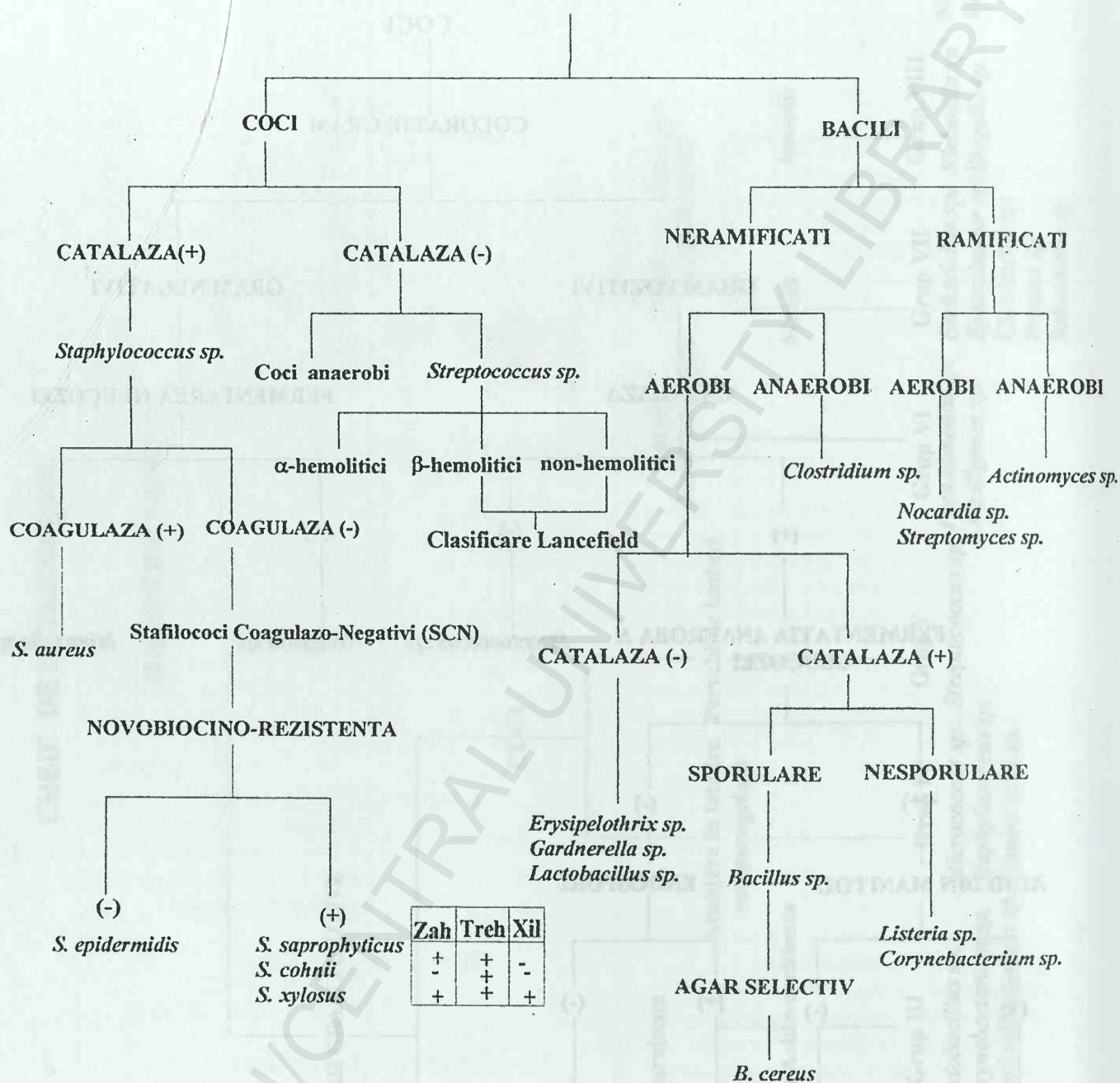


CHEIE DE DETERMINARE

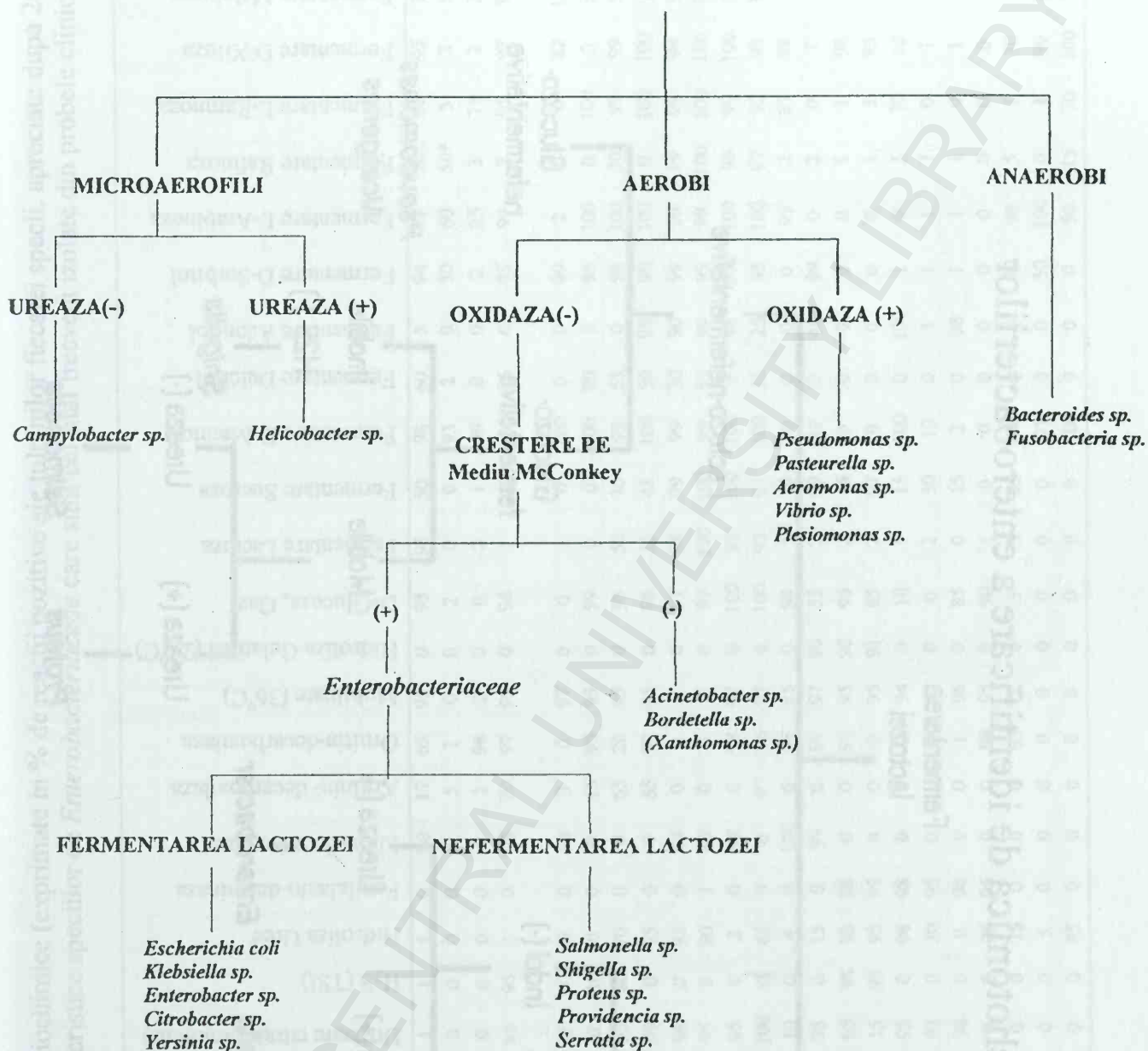


CHEIE DE DETERMINARE

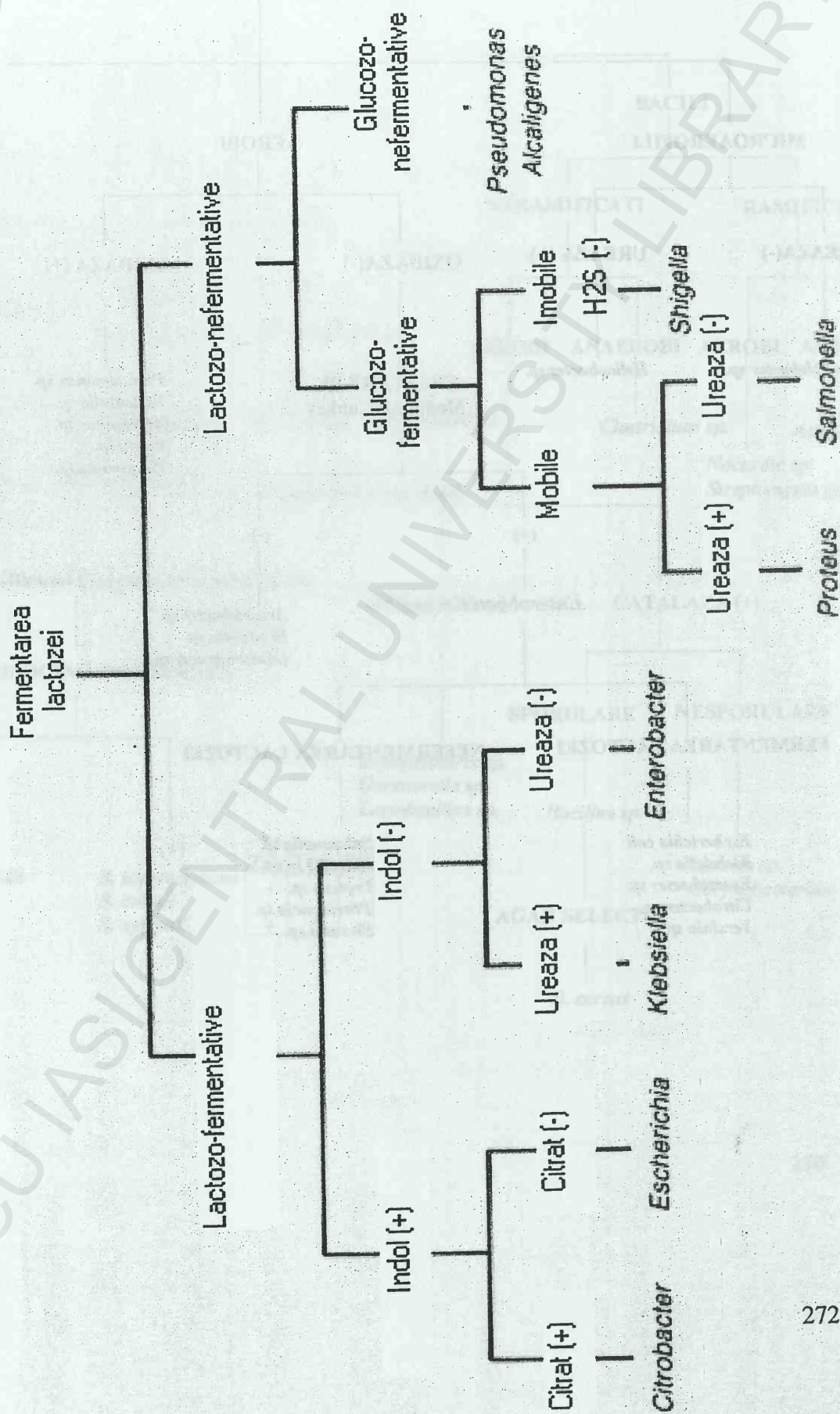
BACTERII GRAM POZITIVE DE IMPORTANTA MEDICALA



BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANTA MEDICALA



Cheie dichotomica de identificare a enterobacteriilor



Tabel nr.13. Rezultatele testelor biochimice (exprimate în % de reacții pozitive ale tulpinilor fiecărei specii, apreciate după 24-48 ore de incubare la 37°C) caracteristice speciilor de *Enterobacteriaceae* care sunt cel mai frecvent izolate din probele clinice

Specii	Producere de Indol	Testul Rosu-metil	Reacția Voges-Proskauer	Utilizare citrat (Simmons)	H ₂ S (TSI)	Hidroliza Uree	Fenilalanin-deaminaza	Lizin-decarboxilaza	Arginin-decarboxilaza	Ornitin-decarboxilaza	Mobilitate (36°C)	Hidroliza Gelatinei (22°C)	D-Glucoza, Gaz	Fermentare Lactoza	Fermentare Sucroza	Fermentare D-Manitol	Fermentare Dulcitol	Fermentare Adonitol	Fermentare D-Sorbitol	Fermentare L-Arabinosa	Fermentare Rafinoza	Fermentare L-Ramnoza	Fermentare D-Xiloza	Fermentare Melobioza	Dnaza, 25°C	ONPG*
<i>Escherichia coli</i>	98	99	0	1	1	1	0	90	17	65	95	0	95	95	50	98	69	5	94	99	50	80	95	75	0	95
<i>Shigella</i> serogr. A, B, C	50	100	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	2	0	0	93	2	0	30	60	50	5	2	50	0	2
<i>Shigella sonnei</i>	0	100	0	0	0	0	0	0	2	98	0	0	0	2	1	99	0	0	2	95	3	75	2	25	0	90
<i>Salmonella</i>	1	100	0	95	95	1	0	98	70	97	95	0	96	1	1	100	96	0	95	99	2	95	97	95	2	2
majoritatea erotipurilor																										
<i>Salmonella typhi</i>	0	100	0	0	97	0	0	98	3	0	97	0	0	1	0	100	0	0	99	2	0	0	82	100	0	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	0	100	0	0	10	0	0	0	15	95	95	0	99	0	0	100	90	0	95	100	0	100	0	95	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	5	100	0	95	80	70	0	0	65	20	95	0	95	50	30	99	55	0	98	100	30	99	99	50	0	95
<i>Citrobacter diversus</i>	99	100	0	99	0	75	0	0	65	99	95	0	98	35	45	100	50	98	99	100	0	100	100	0	0	96
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	10	98	98	0	95	0	98	0	0	0	0	97	98	99	99	30	90	99	99	99	99	99	0	0	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95	0	90	1	99	0	0	0	0	97	100	100	99	55	99	99	98	100	100	100	99	0	100
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	5	98	95	0	2	0	98	0	98	97	0	100	95	100	100	5	98	100	100	96	99	100	99	0	100
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	5	100	100	0	65	0	0	97	96	95	0	100	93	97	100	15	25	95	100	97	92	99	90	0	99
<i>Hafnia alvei</i>	0	40	85	10	0	4	0	100	6	98	85	0	98	5	10	99	0	0	0	95	2	97	98	0	0	90
<i>Serratia marcescens</i>	1	20	98	98	0	15	0	99	0	99	97	90	55	2	99	99	0	40	99	0	2	0	7	0	98	95
<i>Proteus mirabilis</i>	2	97	50	65	98	98	98	0	0	99	95	90	96	2	15	0	0	0	0	0	1	1	98	0	50	0
<i>Proteus vulgaris</i>	98	95	0	15	95	95	99	0	0	0	95	91	85	2	97	0	0	0	0	0	1	5	95	0	80	1
<i>Providencia rettgeri</i>	99	93	0	95	0	98	98	0	0	0	94	0	10	5	15	100	0	100	1	0	5	70	10	5	0	5
<i>Providencia stuartii</i>	98	100	0	93	0	30	95	0	0	0	85	0	0	2	50	10	0	5	1	1	7	0	7	0	10	10
<i>P. alcalifaciens</i>	99	99	0	98	0	0	98	0	0	1	96	0	85	0	15	2	0	98	1	1	1	0	1	0	0	1
<i>Morganella morganii</i>	98	97	0	0	5	98	95	0	0	98	95	0	90	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	50	97	2	0	0	75	0	0	0	95	2	0	5	5	95	98	0	0	99	98	5	1	70	1	5	95
<i>Yersinia pestis</i>	0	80	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	97	0	0	50	100	0	1	90	20	0	50
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0	100	0	0	0	95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	50	15	70	100	70	0	70

*ONPG – o-nitrofenil-β-D-galactopiranozid

Tabel nr. 14. Caracterele morfologice si biochimice ale unor specii de levuri ale genului *Candida*, de importanta medicala

Specia	TESTE DE FERMENTATIE										TESTE DE ASIMILATIE							Celule vegetative (forma si dimensiuni)
	D-Glucoza	D-Galactoza	Zaharaza	Maltoza	Celobioza	Trehaloza	Lactoza	Rafinoza	Melezitoza	D-Xiloza	L- Arabinoza	Eritritol	Ribitol	D- Manitol	Metil α-D-glucozid	Inozitol	Nitrat	
<i>C. albicans</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	Globular-ovoideale, 3,5 - 6 x 6 - 10 μm
<i>C.guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	Ovoideale, 2 - 4,5 x 2,5 - 7 μm
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ovoidal-cilindrice, 3 - 5 x 6 - 20 μm
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	Ovoidal-cilindrice, 3 - 5 x 5 - 11 μm
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	Globular-ovoideale, 1,5- 6x 2,5-10 μm
<i>C. macedoniensis</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	Ovoideale, 2,5 - 6 x 4,5 - 9 μm
<i>C.membranifaciens</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	Globular-ovoideale, 3 - 6 x 3,5 - 7 μm
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	Ovoideale, 2,5 - 4 x 2,5 - 9 μm
<i>C.pseudotropicalis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	Ovoideale, 2,5 - 5 x 5 - 10 μm
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	Ovoideale, 4 - 8 x 5- 10 μm
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	Globular-ovoideale, 4 - 8 x 5 - 11 μm
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	Ovoideale, 1,5 - 5 x 4 - 10 μm

Caractere: (+) = pozitiv; (-) = negativ; v = variabil.

Medii de cultura de uz microbiologic (retete)

Mediu AABTL – vezi m. Drigalski

Mediu cu ADN si albastru de toluidina - recomandat pentru identificarea speciilor de *Stafilococcus aureus* producatoare de DN-aza (termonucleaza), cu compozitia:

Acid deoxiribonucleic (ADN).....	0.3 g
Clorura de calciu (0.01 M).....	1.0 ml
NaCl.....	10.0 g
Albastru de toluidina	3.0 ml
Agar-agar	10.0 g
TRIS tampon.....	1000.0 ml
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min	
Incubare la 35-37°C, 2 h.	

Mediu Agar AMIDON - este recomandat pentru identificarea Actinomycetelor aerobe, are urmatoarea compozitie (g/l):

Extract de carne	3.0 g
Gelatina Peptona	5.0 g
Agar-agar.....	15.0 g
Amidon de cartof	10.0 g
pH final = 7.3 +/- 0.2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min	

Mediu Agar CETRIMID - recomandat pentru procedeele calitative de izolare selectiva si identificare prezumtiva a speciei *Pseudomonas aeruginosas* (stimuleaza pigmentogeneza, iar cetrimidul inhiba dezvoltarea altor bacterii; are urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....	20.0 g
Sulfat de potasiu	10.0 g
Glicerol.....	10.0 g
Clorura de magneziu.....	1.4 g
Fosfat monopotasice.....	1.0 g
Cetrimid.....	0.3 g
Agar-agar.....	13.0 g
pH final = 7.2 +/- 0.2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min	

Mediu Agar CHOCOLAT – recomandat pentru izolarea si cultivarea speciilor de *Neisseria* si *Haemophilus*, cu urmatoarea formula:

Cazeina peptona.....	7.5 g
Peptona	7.5 g
Amidon de porumb	1.0 g
Fosfat dipotasice.....	4.0 g
Fosfat monopotasice.....	1.0 g
Hemoglobina.....	10.0 g
GCHI (supliment).....	10.0 ml
NaCl.....	5.0 g
Agar-agar.....	10.0 g
pH final = 7.2 +/- 0.2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min	

Mediu Agar MICOBOTIC - este recomandat pentru izolarea microfungilor patogeni din probele clinice, care pot fi contaminate cu bacterii si fungi saprotrofi; are compozitia (g/l):

- Peptona de soia 10.0 g
- Dextroza 10.0 g
- Agar-agar.....15.0 g
- pH 6,5 +/- 0,2
- Sterilizare prin autoclavare la 115° C, 15 min (se adauga apoi solutii de antibiotice, sterilizate prin filtrare) :
- Cicloheximida.....400.0 mg
- Cloramfenicol 50.0 mg

Mediu Agar NITRAT – este recomandat pentru determinarea reducerii nitratilor de catre bacterii si are compozitia (g/l):

- Peptona 5.0 g
- Extract de carne.....3.0 g
- Nitrat de potasiu 1.0 g
- Agar-agar.....12.0 g
- pH final = 6,8 +/- 0,2
- Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu Agar PPLO cu inhibitori - mediu solid recomandat pentru izolarea speciilor de *Mycoplasma*, cu urmatoarea compozitie:

- Infuzie din cord bovin 50.0 g
- Peptona 10.0 g
- NaCl 5.0 g
- Extract de drojdii 25% 100.0 g
- Acetat de talium 0.25 g
- Agar -agar.....14.0 g
- Apa distilata 700.0 ml.
- pH final = 7,8 +/- 0,2
- Sterilizare prin autoclavare la 121 °C, 20 min ; apoi se adauga serul de cal si solutiile de antibiotice, sterilizate prin filtrare :
- Ser de cal 200.0 ml
- Amfotericina B 2.5 mg
- Penicilina 1 million U. I.

Mediu – AGAR PSEUDOMONAS CEPACIA (PC) - este recomandat pentru izolarea speciei *Pseudomonas cepacia* (denumire actuala: *Burkholderia cepacia*), are compozitia:

- Acid piruvic 10%.....50.0 ml
- Proteoza peptona 1.0 g
- Saruri biliare 1.5 g
- Cristal violet 1.0 mg
- Sulfat de amoniu 1.0 g
- Sulfat de magneziu 0.2 g
- Sulfat feros de amoniu.....0.01 g
- Rosu fenol 0.02 g
- Agar-agar.....15.0 g
- Tampon fosfat de potasiu 950.0 ml.
- pH final 6.2 +/- 0.1
- Sterilizare prin autoclavare la 121°C; apoi se adauga antibioticele, sub forma de solutii sterile :
- Ticarcilina.....0.1 g
- Polimixina B 300000 U

Mediu – AGAR PSEUDOMONAS F SI AGAR PSEUDOMONAS P - este recomandat pentru diferentierea speciei *Pseudomonas aeruginosa*, bazata pe evidentierea fluorescentei (F Agar) si a piocianinei (P Agar), cu formulele (g/l):

Pseudomonas F Agar:

Cazeina Peptona	10.0	g
Peptona de carne	10.0	g
Glicerol	10.0	ml
Sulfat de magneziu	1.5	g
Fosfat dipotasic	1.5	g
Agar-agar.....	15.0	g

pH final = 7,0+/- 0,2

Sterilizare la 121°C, 20 min

Pseudomonas P Agar:

Gelatina Peptona	20.0	g
Sulfat de potasiu	10.0	g
Glicerol	10.0	ml
Clorura de Magneziu	1.4	g
Agar-agar.....	13.6	g

pH final = 7,0 +/- 0,2

Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min.

Mediu BAIRD – PARKER – mediu selectiv, pentru izolarea si determinarea cantitativa (UFC/g produs) a stafilococilor coagulazo-pozitivi din alimente, cu urmatoarea formula (g/l):

Triptona.....	10	g
Extract de carne (<i>Lab-Lemco powder</i>).....	5	g
Extract de drojdii.....	1	g
Piruvat de sodiu.....	10	g
Glicina.....	12	g
Clorura de litiu.....	5	g
Agar.....	20	g

pH final 6,8+/- 0,2

Mediul se incalzeste pâna la dizolvarea completa a ingredientelor.

Sterilizare prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min

Dupa racirea mediului la 50°C, se adauga in mod steril 50 ml de emulsie* galbenus de ou –telurit (SR 54). Mediul se amesteca bine inainte de solidificare. Placile se pastreaza la 4°C.

* echivalentul a 3 ml solutie 3,5% telurit de potasiu.

Mediu BORDET- GENGOU – mediu solid selectiv pentru izolarea speciilor *Bordetella pertussis* si *B. parapertussis*, cu urmatoarea compozitie (g/l):

Infuzie de cartof.....	4,5	g
Proteoza peptona.....	10,0	g
NaCl.....	5,5	g
Agar-agar.....	16,0	g

pH final = 6,7 +/- 0,2

Sterilizare prin autoclavare la 121°C, timp de 15 min

Dupa racirea mediului la 40 – 50°C, se adauga 150 – 200 ml de sânge defibrinat de cal (incalzit la 37°C) si 40 mg cephalexin (substanta pura, rehidratata - solutie sterila).

Mediu BGN (Bulion pentru Gram negativi - este recomandat pentru cresterea selectiva a bacililor Gram - negativi, are compozitia:

Cazeina peptona.....	10.0	g
Peptona	10.0	g
NaCl	5.0	g

Citrat de sodiu	5.0	g
Fosfat dipotasic	4.0	g
D-Manitol	2.0	g
Dextroza	1.0	g
Fosfat monopotasic	1.5	g
Dezoxicolat de sodiu	0.5	g

pH final = 7.0 +/- 0.2. Incubare aeroba la 35-37°C , 18-24 h .
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, timp de 30 min

Mediu BULION NUTRITIV, folosit pentru cultivarea unui numar mare de bacterii, are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona	10g
Extract de carne	10g
NaCl	5g

pH final = 7,2 – 7,4
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu BULION SELENIT (+/-Cisteina) - recomandat ca mediu de imbogatire, pentru izolarea speciilor de *Salmonella*; are urmatoarea compozitie (g/l):

Fosfat de Sodiu	10.0	g
Lactoza	4.0	g
Cazeina Peptona	5.0	g
Selenit de Sodiu	4.0	g

pH final = 7,0 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min

Optional se poate adauga:

L-Cisteina	0.01	g
------------------	------	---

Mediu BULION de SOIA - recomandat pentru izolarea si cultivarea a numeroase microorganisme, are compozitia (g/l) :

Cazeina peptona	17.0	g
Peptona de soia	3.0	g
NaCl	5.0	g
Fosfat dipotasic	2.5	g
Dextroza	2.5	g

pH final = 7,3 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu BULION de SOIA TRIPTICAZA / 15% GLICEROL - este recomandat pentru pastrarea in colectie a bacteriilor (prin congelare), are compozitia:

Cazeina peptona	17.0	g
NaCl	5.0	g
Peptona de soia	3.0	g
Fosfat dipotasic	2.5	g
Dextroza	2.5	g
Glicerol	150.0	ml
Apa distilata	850.0	ml

pH final = 7.3 +/- 0,2 .
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu BULION de SOIA TRIPTICAZA / 6.5% NaCl - este recomandat pentru diferentierea enterococilor, de streptococi din grupul D, are compozitia (g/l):

NaCl	65,0	g
------------	------	---

Cazeina peptona 17.0 g
 Fosfat dipotasic 2.5 g
 Peptona de soia 3.0 g
 Dextroza 2.5 g
 pH final = 7.3+/- 0.2
 Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu CARY – BLAIR – mediu semisolid de transport, pentru materii fecale (repartizat in coprocultoare), cu urmatoarea compozitie (g/500 ml):

Fosfat monoacid de sodiu 1,1 g
 Tioglicolat de sodiu.....1,5g
 NaCl.....5 g
 Clorura de calciu.....0,09g
 Agar-agar.....5,6g
 pH final = 8,4 +/- 0,2
 Sterilizare prin fierbere (100°C), timp de 15 min

Mediu CHRISTENSEN – mediu pentru evidentiarea producerii ureazei; mediul contine (g/l):

Peptona din carne.....1g
 Glucoza.....1g
 NaCl 5g
 Fosfat acid de amoniu.....2g
 Rosu neutru.....0,012g
 Agar-agar.....12g
 pH final = 6,8 +/- 0,2
 Se adauga uree, solutie 20 g/l;
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu - CISTEINA TRIPTICAZA AGAR (CTA) cu lichid de ascita si/sau carbohidrati – este recomandat pentru determinarea reactiilor de fermentatie la organismele pretentioase, cum ar fi : Neisseria , pneumococi, streptococi si anaerobi nesporogeni si are compozitia (g/l):

Mediu de baza:

Cazeina peptona 20.0 g
 L- Cisteina 0.5 g
 NaCl 5.0 g
 Sulfit de sodiu 0.5 g
 Rosu fenol 17.0 mg
 Agar-agar.....2.5 g
 pH final =7.3+/- 0.2
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Optional se adauga in mod steril per litru de mediu CTA, solutii concentrate de glucide, care sa realizeze concentratii finale de 10g glucid /l mediu sau lichid de ascita.

Mediu pentru DERMATOFITI - recomandat pentru izolarea selectiva a microfungilor dermatofiti, are compozita (g/l):

Peptona de soia 10.0 g
 Dextroza.....10.0 g
 Rosu fenol 0.2 g
 Agar -agar.....20.0 g
 pH final= 5.5+/- 0.2

Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min, apoi adaugare de antibiotice -solutii sterile :
 Cicloheximida 0.5 g
 Cloramfenicol.....0.1 g
 Gentamicina.....0.1 g

Mediu DRIGALSKI = m. AABTL (Agar Albastru de Brom Timol Lactoza), mediu de diagnostic diferential (neselectiv), care permite diferentierea lactozo-fermentativilor (care formeaza colonii de culoare galbena + mediul in jur), de lactozo-nefermentativi (care formeaza colonii de culoare verde-albastra). Are urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....	15g
Extract de carne.....	3g
Extract de drojdii.....	3g
Tiosulfat de sodiu.....	1g
Lactoza.....	15g
Albastru de bromtimol.....	0,08g
Agar-agar.....	11g
pH final = 7,4 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min.	

Mediu EMB AGAR (LEVINE) – este recomandat pentru izolarea si diferentierea speciilor de bacili Gram-negativi enterici (pt. analiza bacteriologica a apei), are compozitia (g/l):

Peptona	10.0	g
Lactoza.....	10.0	g
Fosfat dipotasic	2.0	g
Eozina Y	0.4	g
Albastru de metilen.....	0.065	g
Agar -agar.....	15.0	g
pH final = 7.1 +/- 0.2 .		
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min.		

Mediu solid cu ESCULINA– este recomandat pentru detectarea capacitatii de a hidroliza esculina si are compozitia (g/l):

Extract de cord bovin	2.0	g
Cazeina peptona	13.0	g
NaCl.....	5.0	g
Extract de drojdii	5.0	g
Vitamina K	10.0	mg
Hemina.....	5.0	g
Esculina.....	1.0	g
Citrat feric amoniacal.....	0.5	g
Agar	15.0	g
pH final = 7.0 +/- 0.2		

Mediu cu GELATINA – este recomandat pentru determinarea capacitatii microorganismelor de a lichefia gelatina (proteoliza); are compozitia:

Peptona	5.0	g
Extract carne.....	3.0	g
Gelatina	12.0	g
pH final = 6.8 +/- 0.2		
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min		

Mediu GELOZA NUTRITIVA, folosit pentru cultivarea unui numar mare de bacterii , are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona.....	10g
Extract de carne.....	10g
NaCl.....	5g
Agar-agar.....	20g
pH final = 7,2 – 7,4	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min.	

Mediu GELOZA – SANGE, folosit pentru izolarea si cultivarea unui numar mare de bacterii, ca si pentru evidentierea proprietatilor hemolitice (stafilococi, streptococi, hemofili etc.).
La geloza nutritiva, racita la 45 – 50°C, se adauga 5 – 7% sânge de oaie (de obicei) recoltat in mod steril sau suspensie de hematii 50% in solutie Alsever) si amestecul se omogenizeaza cu miscari blânde.

Mediu solid pentru HAEMOPHILUS sp. – este recomandat pentru izolarea si cultivarea hemofililor, care necesita anumiti factori de crestere si produc hemoliza pe mediu cu sânge de cal;
Formula (g/l) mediului de baza:

Extract de cord bovin	2.0 g
Cazeina peptona	13.0 g
Extract de drojdii	5.0 g
NaCl	5.0 g
Agar	15.0 g
pH final = 7.4 +/- 0.2	

Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Se adauga in mod steril, per litru de mediu, ce se repartizeaza apoi in placi cu cadrane:

Hemina (cadranele I si III)	20.0 mg
Sânge de cal (cadranel IV).....	50.0 ml
NAD (cadranel II, III si IV).....	0.1 g

Mediu HUGH – LEIFSON- este recomandat pentru determinarea metabolismului oxidativ si fermentativ al hidratilor de carbon de catre bacilii gram-negativi; are urmatoarea compozitie (g/l):

Mediu de baza :

Cazeina peptona	2.0 g
NaCl	5.0 g
Fosfat dipotasice	0.3 g
Albastru de brom timol.....	35.0 mg
Agar – agar	2.5 g
pH final = 6,8 +/- 0,2	

Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Se adauga câte unul din glucidele urmatoare, in concentratie finala de 10 g/ litru de mediu, sub forma unor solutii concentrate, sterilizate prin filtrare: arabinoza, dextroza, dulcitol , fructoza, galactoza, glicerol, lactoza, maltoza, manitol, manoză, rafinoza, ramnoza, salicina, zaharoza, xiloza. In tuburile cu mediu se pot adauga tuburi Durham, pentru evidentierea producerii de gaze.

Mediu LOWENSTEIN-JENSEN (mediu ou - cartof glicerinat) pentru cultivarea micobacteriilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Faina de cartof.....	30g
Glicerol.....	12 ml
Asparagina.....	3,6g
Fosfat monopotasic.....	2.4g
Sulfat de magneziu.....	0,24g
Citrat de magneziu.....	0,6g
Verde malahit.....	0,4g
Apa distilata.....	600ml
Sterilizare prin autoclaare la 110°C, 15 min, dupa care se adauga in mod steril:	
Ou integral.....	1000ml

Mediu cu MANITOL (CHAPMAN) – mediu cu manitol, pentru stafilococi, cu formula (g/l):

Peptona.....	10g
Manitol.....	10g
NaCl.....	75g

Rosu fenol..... 0,025
 Agar-agar.....15
 pH final = 7,5 +/- 0,2
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min

Mediu Mac CONKEY – mediu selectiv pentru enterobacterii, care evidentiaza si speciile lactozo-fermentative, cu urmatoarea formula (g/l):

Peptona.....20g
 Lactoza.....10g
 Saruri biliare.....5g
 NaCl.....5g
 Rosu neutru.....30mg
 Cristal violet..... 1mg
 Agar-agar.....12g
 pH final = 7,4 +/- 0,2
 Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu MILF (mobilitate, indol, lizin decarboxilaza, fenilalanil dezaminaza) – mediu multitest, cu formula (g/l):

Extract de drojdii.....3g
 L-lizina.....5g
 DL-fenilalanina.....4g
 DL-triptofan.....0,1g
 Glucoza..... 0,75g
 NaCl.. 5 g
 Purpura de bromcrezol 1/500.....8ml
 Agar-agar.....3g
 pH final = 6,8 +/- 0,2
 Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu MRS lichid (cu tuburi Durham) - mediu utilizat pentru cultivarea speciilor de *Lactobacillus* si pentru diferentierea cocilor gram-pozitivi, cu urmatoarea compozitie (g/l):

Gelatina Peptona 10.0 g
 Extraxt bovin 8.0 g
 Extract de drojdii 4.0 g
 Dextroza 20.0 g
 Fosfat dipotasic 2.0 g
 Polisorbat 80 1.0 g
 Acetat sodic 5.0 g
 Citrat de amoniu 2.0 g
 Sulfat de magneziu 0.2 g
 Sulfat de mangan 0.05 g
 pH final = 6,2 +/- 0,2
 Sterilizare la 115°C, 15 min

Mediu MRVP lichid – recomandat a fi utilizat in testele Rosu-Metil si Voges Proskauer si in identificarea bacililor enterici gram-negativi, cu urmatoarea compozitie:

Cazeina peptona 3.5 g
 Peptona 3.5 g
 Dextroza 5.0 g
 Fosfat dipotasic 5.0 g
 pH final= 6,9 +/- 0,2
 Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min

Mediu MUELLER HINTON lichid - este recomandat pentru determinarea sensibilitatii bacteriilor la antibiotice si agenti antimicrobieni in general si pentru determinarea concentratiei minime inhibitorii (C.M.I.) prin metoda dilutiilor seriale a substantei antimicrobiene. Acest mediu este recomandat si pentru cultivarea unei varietati largi de microorganisme. Are urmatoarea compozitie (g/l):

Extract de carne.....2.0 g
 Amidon solubil.....1.5 g
 Hidrolizat de cazeina.....17.5 g
 pH 7.3+/- 0.1
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu MUELLER HINTON solid - mediu standard recomandat pentru testarea rezistentei la antibiotice a bacteriilor aerobe si facultativ anaerobe (prin metoda difuzimetriei Kirby-Bauer), cu urmatoarea compozitie (g/l):

Extract de carne 2.0 g
 Amidon 1.5 g
 Hidrolizat de cazeina.....17.5 g
 Agar-agar.....17.0 g
 pH final = 7,2 - 7,4
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Mediu O.M.S. - mediu semisolid, recomandat de Organizatia Mondiala a Sanatatii, pentru conservarea in laborator a enterobacteriilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Bactopeptona.....10 g
 NaCl.....5 g
 Agar-agar.....4 g
 pH final = 7,2
 Sterilizare la 121°C, 20 min

Mediu P.R.A.S. - este recomandat pentru transportul speciilor de bacterii anaerobe sensibile la oxigen si are urmatoarea compozitie (g/l) :

Peptona 10.0 g
 Extract de drojdii 10.0 g
 Hidroclorid de L- Cisteina 0.5 g
 VPI.....40.0 g
 Resazurina.....4.0 ml
 pH final = 7.0+/- 0.2
 Sterilizare la 121°C, 20 min

Mediu ROSU FENOL - este recomandat pentru determinarea proceselor fermentative ale microorganismelor; are compozitia (g/l):

Mediu de baza:

Cazeina peptona 10.0 g
 NaCl.....5.0 g
 Rosu fenol 18.0 mg
 pH final = 7,4+/- 0,2
 Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min

Urmatorii carbohidrati sunt utilizati per litru de mediu: adonitol , arabinoza, celobioza, dextroza, dulcitol, eritritol, fructoza, galactoza, glicerol, inozitol, lactoza, maltoza , manitol , manoza, melibioza, rafinoza, ramnoza, salicina, sorbitol, zaharoza, trehaloza, xiloza.

Mediu SABOURAUD-dextroza, pentru izolarea si cultivarea microfungilor, cu urmatoarea formula (g/l):

Cazeina- peptona.....	5g
Peptona din carne.....	5 g
Dextroza.....	40 g
Agar-agar.....	20 g
pH final = 5,6 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min	

Mediu SELLERS solid - este recomandat pentru diferentierea si identificarea bacililor Gram-negativi, nefermentativi , are compozitia (g/l):

Peptona	20.0 g
NaCl	2.0 g
D- Manitol	2.0 g
Sulfat de Magneziu	1.5 g
Extract de drojdii	1.0 g
L-Arginina	1.0 g
Fosfat dipotasic	1.0 g
Nitrat de sodiu	1.0 g
Nitrit de sodiu	0.35 g
Albastru de brom timol.	0.04 g
Rosu fenol	8.0 g
Agar -agar.....	15.0 g
pH 6.7+/- 0.2	
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min	

Mediu SIMMONS – mediu pentru evidentiarea utilizarii citratului ca unica sursa de carbon; mediul are formula (g/l):

Fosfat acid de amoniu.....	1g
Fosfat monoacid de potasiu.....	1g
NaCl.....	5g
Citrat de sodiu.....	2g
Sulfat de magneziu.....	0,2g
Albastru de brom timol.....	0,08g
Agar-agar.....	15g
pH final = 6,8 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min	

Mediu S.S. – recomandat inalt selectiv si diferential pentru izolarea speciilor de Salmonella si Shigella din produse patologice si alimente contaminate; cu urmatoarea formula (g/l):

Extract de carne.....	5.0 g
Peptona.....	5.0 g
Lactoza.....	10.0 g
Saruri biliare.....	5.5 g
Citrat de sodiu.....	10.0 g
Tiosulfat de sodiu.....	8.5 g
Citrat feric.....	1.0 g
Verde brilliant.....	0.00033 g
Rosu neutru.....	0.025 g
Agar-agar.....	12.0 g
pH final = 7,3 +/- 0,2	
Sterilizare prin afierbere (nu se autoclaveaza)	

Mediu Nr. 110 pentru *Staphylococcus sp.* , cu urmatoarea formula(g/l):

Extract de drojdii.....	2.5g
Tryptona.....	10.0g
Lactoza.....	2.0g
Manitol.....	10.0g
NaCl.....	5.0g
Fosfat acid dipotasic.....	5.0 g
Gelatina.....	30.0g
Agar-agar.....	15.0g
pH final = 7,1 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 15 min	

Mediu de transport STUART - recomandat pentru transportul si conservarea speciilor de microorganisme, are urmatoarea compozitie (g/l):

Glicerofosfat de sodiu	10.0 g
Tioglicolat de sodiu	1.0 g
Clorura de calciu	0.1 g
Albastru de metilen	2.0 mg
Agar-agar	3.0 g
pH final = 7,4 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 121°C, 20 min	

Mediu TCBS (Thiosulphate Citrate Bile Sucrose) - este recomandat pentru izolarea selectiva a speciei *Vibrio cholerae* si a altor specii enteropatogene de *Vibrio*, are compozitia:

Peptona.....	10.0 g
Extract de drojdii	5.0 g
Citrat de sodiu	10.0 g
Tiosulfat de sodiu	10.0 g
Ox Bile.....	8.0 g
Zaharoza	20.0 g
NaCl.....	10.0 g
Citrat feric	1.0 g
Albastru de brom timol.....	0.04g
Timol	0.04g
Agar	15.0 g
pH final 8.6 +/- 0.2	
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min (sau doar prin fierbere).	

Mediu THAYER - MARTIN solid - recomandat pentru izolarea speciilor de *Neisseria gonorrhoeae* si *Neisseria meningitidis*, are compozitia:

Cazeina Peptona	7.5 g
Peptona.....	7.5 g
Amidon	1.0 g
Fosfat dipotasic	4.0 g
Fosfat monopotasic	1.0 g
NaCl	5.0 g
Solutie de hemoglobina	350.0 ml
GC (supliment Oxoid pt. neisserii).....	10.0 ml
Dextroza	1.5 g
Agar	10.0 g
Apa distilata	650.0 ml
pH final = 7,2 +/- 0,2	
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 15 min, apoi adaugare de	

Antibiotice - solutii sterile: Lactat trimetoprim

Colistin	7.5 mg
Nistatin	12500 IU
Vancomicina.....	4.0 mg

Mediu TINSDALE solid, recomandat pentru izolarea si cultivarea corinebacteriilor, are urmatoarea formula (g/l) :

Proteoză peptona 20g
Extract de drojdii.....5g
NaCl.....5g
L-cisteina.....0,24g
Agar-agar.....15g
pH final = 8 (dupa adaugarea suplimentului)
Sterilizare prin fierbere.

Supliment : ser bovin.....20ml
Telurit de potasiu.....0.06 g
Tiosulfat de sodiu.....0,085g
Se pastreaza la 4°C

Mediu cu TIOGLICOLAT - recomandat pentru cultivarea bacteriilor anaerobe si microaerofile, cu urmatoarea compozitie (g/l):

Triptonă 15.0 g
Dextroza 5.5 g
Extract de drojdii.....5.0 g
NaCl 2.5 g
Tioglicolat de sodiu 0.5 g
L-Cistina 0.5 g
Sulfit de sodiu 0.1 g
Rezazurina.....0,001g
Agar-agar.....0.5 g
pH final = 7,1+/- 0,2 .
Sterilizare prin autoclavare la 121°, 15 min

Mediu TSI (triple sugars iron agar) - mediu multitest, cu urmatoarea formula:

Peptona.....5g
Extract de carne.....3g
Extract de drojdii.....3g
Glucoza.....1g
Lactoza.....10g
Zaharoza 10g
NaCl 5 g
Tiosulfat de sodiu.....0,5g
Agar-agar.....12g
pH final = 6,8 +/- 0,2
Sterilizare prin autoclavare la 0,5 atm, 30 min

Mediu Y.P.G. – recomandat pentru cultivarea si pastrarea in colectie a levurilor, cu urmatoarea compozitie (g/l):

Extract de drojdii.....10g
Peptona.....10g
Glucoza.....20g
pH final = 6 +/- 0.2
Sterilizare prin autoclavare la 115°C, 30 min.

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 1813/2007 la
Tipografia Editurii Universității din București

Caracterul interdisciplinar al Microbiologiei medicale, care decurge din îmbinarea noțiunilor de Microbiologie generală, Imunologie, Biochimie și Genetică, în explicarea unor mecanisme celulare și moleculare de patogenitate și virulență, al modului de evoluție a procesului infecțios, imprimă dificultate acestui domeniu, atât în însușirea cunoștințelor de către studenți, cât și în redactarea unui manual de Microbiologie medicală.

Necesitatea publicării unui *Manual de Microbiologie medicală* pentru studenții Facultății de Biologie, în contextul existenței în planul de învățământ al anilor terminali a disciplinelor de *Microbiologie medicală* și respectiv *Microbiologie aplicată* – Secția de *Biologie experimentală*, ca și în planul unor mastere (*Biologie medicală* și *Microbiologie – Biotehnologie*), se impune odată cu modernizarea planului de învățământ. În limba română, manualele existente de *Microbiologie medicală* au ca autori medici care nu întotdeauna scot în evidență aspectele biologice ale acestui domeniu biomedical. Prin experiența didactică și de cercetare științifică, autoarea manualului răspunde prin conținutul acestuia tocmai acestor deziderate.

Pe parcursul lucrării sunt caracterizate microbiota normală a organismului uman, relațiile dintre microorganisme și gazdă, microorganismele patogene și proprietățile lor definitorii - patogenitatea și virulența care sunt explicate la nivel molecular, evoluția procesului infecțios și clasificarea infecțiilor, problema rezistenței la antibiotice în prezent, ca și principalele grupe de microorganisme patogene, biologia lor, structura antigenică, cunoștințe pe care se bazează metodele de profilaxie a infecțiilor, ca și metodele de identificare a agenților patogeni și respectiv diagnosticul bolilor infecțioase.

Metodele de diagnostic microbiologic (ale căror principii și etape sunt prezentate succint în ultimul capitol), au înregistrat o perfecționare în sensul miniaturizării, al automatizării unor teste și al rapidității execuției și permit caracterizarea genurilor și speciilor, ca și identificarea precisă și rapidă a acestora. Deși aceste metode de referință rămân utile într-un număr mare de cazuri, metodele moleculare cum ar fi amplificarea genică *in vitro* (PCR) și secvențierea moleculelor de ARN 16S au permis progrese spectaculoase atât în cercetare, cât și în identificarea speciilor, a patovarurilor și diagnosticul bacteriologic de certitudine.

Prof. dr. VICTORIA HERLEA

Facultatea de Biologie – Universitatea din București

